R. UNIVERSITÀ DI PISA

ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE
E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
R. OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

123

O. VERONA

SUL COMPORTAMENTO DEI MICRORGANISMI DI FRONTE AD ALCUNE SOSTANZE COLORANTI, CON PARTICOLARE RIFERIMENTO AL VERDE MALACHITE ED ALLA POSSIBILITÀ DI UNA SUA APPLICAZIONE FITOTERAPICA.

Estratto dal *Bollettino del R. Istit. Sup. Agrario di Pisa*
Volume XI - 1935 - XIV

PREM. STABILIMENTO TIPOGRAFICO G. CURSI E FIGLI - PISA - 1935 XIV

O. VERONA

SUL COMPORTAMENTO DEI MICRORGANISMI DI FRONTE AD ALCUNE SOSTANZE COLORANTI, CON PARTICOLARE RIFERIMENTO AL VERDE MALACHITE ED ALLA POSSIBILITÀ DI UNA SUA APPLICAZIONE FITOTERAPICA.

RIASSUNTO: *L' A. ha condotto numerose ricerche sul potere batteriostatico di molti coloranti organici su Batteri, Lieviti, Funghi. Osservato, in accordo con precedenti ricerche, l'elevato potere inibente dello sviluppo dei microbi posseduto dal verde malachite ha esteso le ricerche con questo colorante avuto riguardo ad una sua eventuale applicazione nella concia delle sementi, nei trattamenti antiperonosporici e in trattamenti chemioterapici interni.*

SOMMARIO

I. – *L'azione inibitoria dei coloranti organici sui microrganismi*

- Breve rassegna dei lavori in argomento.
- Tecnica seguita e colori sperimentati.
- Risultati e conclusioni.

II. – *In particolare: il verde malachite*

- Precedente sperimentazione.
- Il potere antimicrobico del verde malachite
  esperienze con colture brute
  – – – pure
  – su spore di Carie e Carboni
  – sullo sviluppo di zoospore di "Plasmopara viticola„
- Influenza del v. m. sulla germinazione dei semi
- – – – – sullo sviluppo di piante

– Esperienze e considerazioni nei riguardi della possibilità di una sua applicazione pratica:
nei trattamenti di disinfezione dei semi;
– – antiperonosporici, avuto riguardo alla questione dell'adesivo ed alla formazione della leucobase;
nei trattamenti chemioterapici interni.

III. – *Conclusioni generali.*

Lavori citati.

I. – L'azione inibitoria dei coloranti organici sui microrganismi

Breve rassegna dei lavori in argomento.

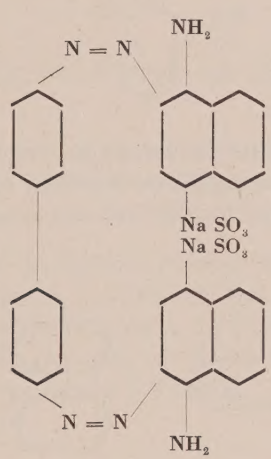
Specialmente su alcuni gruppi di germi l'azione inibitrice delle sostanze coloranti di natura organica, corrispondenti ad aggregati chimici piuttosto complessi, può dirsi sia stata poco indagata.

Generalmente gli studi in materia si riferiscono a germi patogeni per l'uomo o per gli animali e limitatamente ad alcuni dei più comuni colori. Mancano, ad es., ricerche del genere su batteri fitopatogeni e scarse sono quelle relative ai funghi. Ricordiamo a questo proposito i lavori di Houben e Wollemweber ([1]) che studiarono l'azione tossica della esilresorcina e della feniletilresorcina sul *Graphium ulmi;* di Leonian ([2]) che rilevò la tossicità del verde malachite per alcuni *Fusarium, Phytophthora colocasiae* e *P. omnivora;* di Guyot ([3]) che segnalò il potere inibitorio del bleu di metilene sullo sviluppo delle rizomorfe e del micelio dell'*Armillaria mellea;* di Vanderwalle che studiò l'azione del verde malachite su *Botrytis cinerea;* di Dessy ([5]) che sperimentò molte sostanze coloranti su *Mucor mucedo, M. pusillus, M. roseum, M. Calmette, M. Boidin;* di Boudru ([6]) che indagò l'azione tossica di molte sostanze su *Ceratostomella (Graphium) ulmi;* di Verona e Ceccarelli, infine, che sperimentarono su *Verticillium albo-atrum, V. dahliae, V. tracheiphylum, V. amaranti, Acrostalagmus cephalosporioides.*

Delle sostanze da noi studiate potremmo riferire con dettaglio

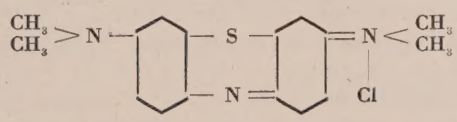
la bibliografia relativa se lavori generici, in argomento ([8]), non ce ne dispensassero suggerendoci soltanto alcuni riferimenti ai composti maggiormente sperimentati.

Rosso Congo



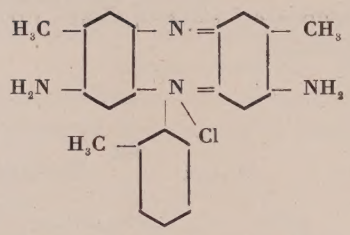
Secondo Graham-Smith ([9]) inibisce lo sviluppo nella concentrazione di 1 : 1000 di *B. coli* e *B. pyocyaneum* e, nel rapporto di 1 : 10.000 di stafilococchi. Per Gay e Morrison ([10]) non si verificherebbero particolari effetti nella concentrazione di 1 : 2000 su *Staphylococcus aureus,* streptococchi e *Bact. typhosum.*

Bleu di metilene :



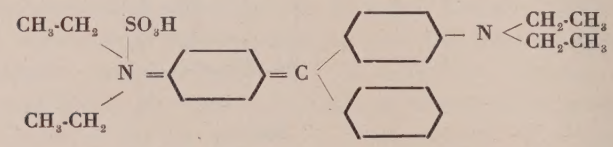
Usato da Holt-Harris e Teagne ([11]) e da Levine come indicatore nelle colture di isolamento dei bacilli del tifo, fu sperimentato attivo nella diluizione di 1 : 2000 su streptococchi e non su *Staphylococcus aureus* e *Bact. typhosum* da Gay e Morrison.

SAFRANINA



Per GAY e MORRISON ha azione su streptococchi nella concentrazione 1:2000 e non su stafilococchi e *Bact. typhosum;* per GRAHAM-SMITH avrebbe azione in 1 : 1000 sul coli e sul piocianeo.

VERDE BRILLANTE



KLIGLER ([12]) lo trova attivo su stafilococchi a 1 : 4000000, su *Bac. sublitis* a 1 : 15000000, sui b. della dissenteria tra 1 : 1500000 1 : 2000000, su *B. coli* a 1 : 550000, su *B. typhosum* 1 : 510000 e su *B. aerogenes* a 1 : 100000. GAY e MORRISON lo accertano inibente lo sviluppo a 1 : 2000000 di streptococchi, a 1 : 20000 di stafilococchi, e a 1 : 2000 di bacilli del tifo. Altre ricerche, sul verde brillante, sono state condotte da BECKWITH ([13]), GILBERT e COLEMAN ([14]), BROWNING e GILMOUR ([15]) e da altri. Sui *Mucor* (DESSY) è attivo a 1 : 40000; su *Ceratostomella ulmi* (BOUDRU) a 1 : 250000; sui *Verticillium* patogeni (VERONA e CECCARELLI) a 1 : 250-500000.

VIOLETTO DI GENZIANA.

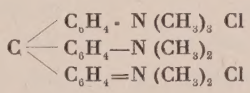
Questo colore è comunemente usato in Batteriologia e numerosissimi esperimenti sono stati eseguiti sulla sua azione batteriostatica. Se ne sono occupati, sempre su b. patogeni, CHURCHMAN ([16]), KRUMVIED e PRATT ([17]), HALL e ELLEFSON ([18]), KLIGLER, BURKE e SKINNER ([19]), HUDDLESON e ABELL ([20]) . . . .

Secondo DESSY su *Mucor roseum* e *M. Calmette* non ha alcuna azione, su *M. mucedo* e *M. Boidin* ha azione a 1 : 10000 e su *M. pusillus* a 1 : 2000. Secondo BOUDRU su *Ceratostomella ulmi* ha azione a 1 : 50-100000; e sui *Verticillium* fitopatogeni, per VERONA e CECCARELLI, a 1 : 100-200000.

VERDE MALACHITE

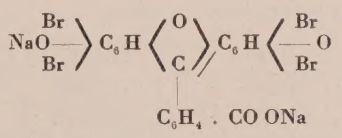
Di questo composto sarà riferito, con dettaglio, più oltre.

VERDE METILE.



È inibente, secondo KLIGLER, lo sviluppo di *Bac. subtilis* 1:50000, di *Staphylococcus aureus* a 1 : 30000, di *Bact. aerogenes, coli, typhosum* a 1 : 1200, di *Proteus vulgaris* a 1 : 2700 e dei b. della dissenteria a 1 : 8000. Nessuna azione ha sui *Mucor* (DESSY) e su *Ceratostomella ulmi* (BOUDRU) ha azione a 1 : 5000.

EOSINA



È stata provata sui b. del tetano da NOGUCHI ([21]) e sui lieviti da MACHT: ha debole azione tossica.

Tecnica seguita e colori sperimentati.

Nell'eseguire queste ricerche non ci siamo prefissi il compito di limitare le indagini ad un gruppo piuttosto che ad un altro di germi. Abbiamo cimentato, di fronte alle varie sostanze coloranti, batteri sia ubiquitari che patogeni, lieviti e funghi anche questi ultimi ubiquitari e patogeni.

I ceppi, dei quali disponiamo nella nostra collezione, sono stati da noi direttamente isolati e studiati, oppure, provengono da altre collezioni.

Circa i colori abbiamo sperimentato con alcuni ad effetti tossici accertati, almeno per determinante specie, e con altri ad azione non ancora ben nota.

Provammo cioè:

1	Rosso Congo	15	Verde brillante
2	– carminio	16	– malachite
3	– metile	17	– metile
4	– neutro	18	Violetto di genziana
5	– fenolo	19	– Dahlia
6	– cresolo	20	Bleu di metile
7	Carminio d' indaco	21	– di anilina
8	Fucsina diamante	22	– timolo
9	Eritrosina	23	Azzurro bromo-fenolo
10	Eosina	24	– – timolo
11	Safranina	25	Bruno Bismarck
12	Sudan III	26	Cresolftaleina
13	Metilorange	27	Fenolftaleina
14	Porpora bromo-cresolo		

tutti, delle Case Merck o Grüber.

In quanto alle concentrazioni usammo:

1 : 1000	1 : 50000
1 : 2000	1 : 100000
1 : 5000	1 : 200000
1 : 10000	1 : 500000
1 : 20000	1 : 750000
	1 : 1000000

Per la tecnica, infine, fu operato come segue: a tubi di coltura contenenti cc. 10 di agar-fagiuoli sterile vennero aggiunte in quantità corrispondenti alle concentrazioni stabilite le sostanze coloranti; indi i tubi vennero nuovamente sterilizzati facendo poi solidificare l'agar in posizione inclinata (*).

(*) Per quanto si riferisce al metodo adottato (a parte la considerazione che esso ci dà indice del potere batteriostatico del colorante e non della sua azione tossica o letale) poichè si fa uso di agar come substrato nutritivo, non sempre es-

Per i batteri e i lieviti l'insemenzamento venne eseguito a mezzo di striscio, per i funghi la semina generalmente venne effettuata con sospensioni di spore in liquido sterile. I tubi si mantennero alla temperatura di 25°C. per un numero di giorni sufficiente onde potere stabilire o meno lo sviluppo dei germi. In tutti casi non oltre 15 giorni.

Il controllo dei risultati venne effettuato non solo ripetendo l'insemenzamento nelle colture a sviluppo negativo ma anche ripetendo le intere prove a distanza di tempo.

Risultati e Conclusioni

I risultati sono riferiti nelle Tab. I-III. Nella prima sono riportati quelli ottenuti su Schizomiceti, nella seconda su Lieviti, nella terza su Funghi. In ognuna, per ogni colore, si hanno generalmente tre colonne: una per la concentrazione *inibente* ed una per la concentrazione *tollerata;* in mezzo, in una terza, è eventualmente segnata la concentrazione del colorante, compresa tra le estreme, che abbia portato ad effetto *dubbio* o che si sia manifestata priva di azione decisamente inibente mentre non è apparsa essere agevolmente tollerata.

Tali risultati appaiono significativi.

La maggior parte delle sostanze coloranti sperimentate si è dimostrata, cioè, ad effetto batteriostatico assai debole se non nullo almeno nei limiti delle concentrazioni più alte provate (1 : 1000).

---

sendo possibile l'impiego di mezzi liquidi o minerali, è da farsi una riserva pregiudiziale che trova la sua ragione nel fatto che la sostanza organica del substrato può adsorbire, in più o meno elevato grado il colorante sì che in parte inattivato, la concentrazione attiva può risultarne modificata.

Da ciò consegue che le concentrazioni date come inibenti hanno valore sopratutto comparativo riguardo ai diversi germi e alle diverse sostanze coloranti e non valore assoluto. Verificandosi fenomeni di adsorbimento è lecito arguire che il loro potere batteriostatico sia più elevato di quello che dalle prove risulti.

Infine, una precauzione che non sembra essere stata presa dai precedenti sperimentatori è quella di operare in mezzo perfettamente neutro. La reazione del substrato deve quindi essere sempre controllata. Ciò ha notevole importanza agli effetti dei risultati poichè molti coloranti modificano la loro azione alterandosi in presenza di ioni H od OH.

TABELLA I. *Effetti di varie sostanze coloranti sullo sviluppo di Schizomiceti.*

MICRORGANISMO	Rosso Congo	Rosso carminio	Rosso metile			Rosso neutro	Rosso fenolo			Rosso cresolo		
	concentr. tollerata	concentr. tollerata	conc. inibente	conc. ad effetto dubbio	conc. toller.	conc. toller.	conc. inibente	conc. ad effetto dubbio	conc. toller.	conc. inibente	conc. ad effetto dubbio	conc. toller.
Micrococcus terrestris Ver.	1:1000	1:1000	1:2000		1:5000	1:1000		1:1000	1:2000	1:1000		1:2000
Sarcina lutea Fl.	1:1000	1:1000	1:1000	1:2000	1:5000	1:1000	1:2000		1:5000	1:2000		1:5000
Bact. florescens liq. (Fl.)	1:1000	1:1000	1:2000		1:5000	1:1000	1:2000		1:5000	1:2000		1:5000
Bact. tumefaciens Smith et Town.	1:1000	1:1000	1:1000		1:2000	1:1000	1:2000	1:5000	1:10000	1:2000		1:5000
Bact. radicicola Bey.	1:1000	1:1000	1:1000			1:1000	1.1000	1:2000	1:5000	1:1000	1:2000	1:5000
Bact. pyocyaneum (Fl.)	1:1000	1:1000	1:1000	1:2000	1:5000	1:1000	1:1000		1:2000	1:1000		1:2000
Bact. coli Esch.	1:1000	1:1000	1:1000		1:2000	1:1000	1:1000		1:2000	1:1000		1:2000
Bact. campestre Pammel	1:1000	1:1000	1:2000		1:5000	1:1000	1:1000	1:2000	1:5000	1:2000		1:5000
Bact. marginale Brown	1:1000	1:1000	1:2000		1:5000	1:1000	1:1000	1:2000	1:5000	1:2000		1:5000
Bact. hyacinthi Wakker	1:1000	1:1000	1:5000		1:10000	1:1000	1:2000		1:5000	1:2000		1:5000
Bact. vitians Brown	1:1000	1:1000	1:1000		1:2000	1:1000	1:2000		1:5000	1:2000		1:5000
Bact. viridolividum Brown	1:1000	1:1000	1:1000	1:2000	1:5000	1:1000	1:2000		1:5000	1:2000		1:5000
Bac. subtilis (Ehr.) Cohn	1:1000	1:1000	1:1000	1:2000	1:5000	1:1000	1:1000	1:2000	1:5000	1:1000	1:2000	1:5000
Bac. asteris Ver.	1:1000	1:1000		1:1000	1:2000	1:1000		1:1000	1:2000	1:2000		1:5000
Bac. mesentericus (Fl.)	1:1000	1:1000	1:1000	1:2000	1:5000	1:1000	1:1000	1:2000	1:5000	1:2000		1:5000
Proteus vulgaris Hauser	1:1000	1:1000	1:2000		1:5000	1:1000	1:2000		1:5000	1:2000		1:5000

Segue TABELLA I.

MICRORGANISMO	Carm. d'indaco	Fucsina diamante			Eritrosina			Eosina		Safranina		Sudan III	
	conc. toller.	conc. inibente	conc. ad effetto dubbio	conc. toller.	conc. inibente	conc. ad affetto dubbio	conc. toller.	conc. inibente	conc. toller.	conc. inibente	conc. toller.	conc. inibente	conc. toller.
Micrococcus terrestris Ver.	1:1000			1:1000		1:1000	1:2000		1:1000		1:1000		1:1000
Sarcina lutea Fl.	1:1000	1:1000		1:2000		1:1000	1:2000	1:1000	1:2000	1:1000	1:2000		1:1000
Bact. florescens liq. (Fl.)	1:1000			1:1000			1:1000		1:1000		1:1000		1:1000
Bact. tumefaciens Smith. et Town.	1:1000			1:1000			1:1000		1:1000		1:1000	1:1000	1:2000
Bact. radicicola Bey.	1:1000	1:1000		1:2000		1:1000	1:2000	1:1000	1:2000	1:1000	1:2000		1:1000
Bact. pyocyaneum (Fl.)	1:1000			1:1000			1:1000		1:1000		1:1000		1:1000
Bact. coli Esch.	1:1000	1:1000	1:2000	1:5000			1:1000		1:1000	1:1000	1:2000		1:1000
Bact. campestre Pammel.	1:1000	1:1000		1:2000		1:1000	1:2000		1:1000		1:1000		1:1000
Bact. marginale Brown.	1:1000	1:1000	1:2000	1:5000			1:1000		1:1000		1:1000		1:1000
Bact. hyacinthi Wakker.	1:1000	1:2000		1:5000	1:1000	1:2000	1:5000		1:1000	1:1000	1:2000		1:1000
Bact. vitians Brown.	1:1000		1:1000	1:2000			1:1000		1:1000	1:1000	1:2000		1:1000
Bact. viridolividum Brown	1:1000			1:1000			1:1000		1:1000		1:1000		1:1000
Bac. subtilis (Ehr.) Cohn.	1:1000	1:1000	1:2000	1:5000		1:1000	1:2000		1:1000	1:1000	1:2000		1:1000
Bac. asteris Ver.	1:1000	1:1000	1:2000	1:5000	1:1000		1:2000		1:1000	1:1000	1:2000		1:1000
Bac. mesentericus (Fl.)	1:1000	1:1000	1:2000	1:5000	1:2000		1:5000		1:1000	1:2000	1:5000		1:1000
Proteus vulgaris Hauser.	1:1000	1:2000		1:5000	1:2000		1:5000	1:1000	1:2000	1:2000	1:5000		1:1000

Segue TABELLA I.

MICRORGANISMO	Metilo-range	Porpora bromo-cresolo		Verde brillante			Verde malachite			Verde metile		
	conc. toller.	conc. ini-bente	conc. toller.	conc. ini-bente	conc. ad effetto dubbio	conc. toller.	conc. ini-bente	conc. ad effetto dubbio	conc. toller.	conc. ini-bente	conc. ad effetto dubbio	conc. toller.
Micrococcus terrestris Ver	1:1000	1:2000	1:5000	1:10000		1:20000	1:10000	1:20000	1:50000	1:1000		1:2000
Sarcina lutea Fl.	1:1000	1:2000	1:5000	1:5000		1:10000	1:5000	1:10000	1:20000	1:2000	1:5000	1:10000
Bact. florescens liq. (Fl.)	1:1000	1:2000	1:5000	1:10000	1:20000	1:50000	1:2000	1:5000	1:10000			1:1000
Bact. tumefaciens Smith. et Town.	1:1000	1:2000	1:5000	1:1000		1:2000	1:1000	1:2000	1:5000			1 1000
Bact. radicicola Bey.	1:1000	1:2000	1:5000	1:50000		1:100000	1:10000	1:20000	1:50000	1:2000		1:5000
Bact. pyocyaneum (Fl.)	1:1000	1:1000	1:2000	1:10000	1:20000	1:50000	1:5000	1:10000	1:20000	1:1000		1:2000
Bact. coli Esch.	1:1000	1:1000	1:2000	1:50000	1:100000	1:200000	1:20000		1:50000	1:1000	1:2000	1:5000
Bact. campestre Pammel.	1:1000	1:1000	1:2000	1:10000		1:20000	1:50000		1:100000	1:1000		1:2000
Bact. marginale Brown.	1:1000	1:2000	1:5000	1:100000		1:200000	1:20000	1:50000	1:100000	1:1000		1:2000
Bact. hyacinthi Wakker.	1:1000	1:2000	1:5000	1:100000		1:200000	1:20000		1:50000	1:2000		1:5000
Bact. vitians Brown.	1:1000	1:2000	1:5000	1:100000		1:200000	1:10000	1:20000	1:50000	1:1000		1:2000
Bact. viridolividum Brown	1:1000	1:2000	1:5000	1:50000		1:100000	1:20000		1:50000	1:1000		1:2000
Bac. subtilis (Ehr.) Cohn.	1:1000	1:5000	1:10000	1:50000	1:100000	1:200000	1:200000	1:500000	1:750000	1:5000		1:10000
Bac. asteris Ver.	1:1000	1:5000	1:10000	1:50000	1:100000	1:200000	1:200000	1:500000	1:750000	1:2000	1:5000	1:10000
Bac. mesentericus (Fl.)	1:1000	1:5000	1:10000	1:50000	1:100000	1:200000	1:200000	1:500000	1:750000	1:2000	1:5000	1:10000
Proteus vulgaris Hauser.	1:1000	1:2000	1:5000	1:50000		1:100000	1:50000	1:100000	1:100000	1:2000		1:5000

Segue TABELLA I.

MICRORGANISMO	Violetto di genziana			Violetto Dahlia		Bleu metile			Bleu anilina	Bleu timolo		
	conc. inibente	conc. ad effetto dubbio	conc. toller.	conc. inibente	conc. toller.	conc. inibente	conc. ad effetto dubbio	conc. toller.	conc. toller.	conc. inibente	conc. ad effetto dubbio	conc. toller.
Micrococcus terrestris Ver	1:10000	1:20000	1:50000	1:2000	1:5000			1:1000	1:1000	1:1000		1:2000
Sarcina lutea Fl.	1:10000	1:20000	1:50000	1:10000	1:20000	1:1000		1:2000	1:1000			1:1000
Bact. florescens liq. (Fl.)	1:2000		1:5000	1:1000	1:2000			1:1000	1:1000		1:1000	1:2000
Bact. tumefaciens Smith. et Town.	1:1000	1:2000	1:5000	1:1000	1:2000			1:1000	1:1000	1:2000		1:5000
Bact. radicicola Bey.	1:20000	1:50000	1:100000	1:2000	1:5000		1:1000	1:2000	1:1000	1:1000		1:2000
Bact. pyocyaneum (Fl.)	1:20000		1:50000	1:5000	1:10000		1:1000	1:2000	1:1000	1:1000		1:2000
Bact. coli Esch.	1:50000	1:100000	1:200000	1:5000	1:10000		1:1000	1:2000	1:1000	1:1000		1:2000
Bact. campestre Gammel.	1:20000	1:50000	1:100000	1:5000	1:10000	1:1000		1:2000	1:1000	1:1000	1:2000	1:5000
Bact. marginale Brown.	1:100000		1:200000	1:5000	1:10000	1:1000		1:2000	1:1000	1:1000		1:2000
Bact. hyacinthi Wakker.	1:100000		1:200000	1:10000	1:20000	1:1000		1:2000	1:1000	1:2000		1:5000
Bact. vitians Brown.	1:100000		1:200000	1:5000	1:10000	1:1000	1:2000	1:5000	1:1000		1:1000	1:2000
Bact. viridolividum Brown	1:100000		1:200000	1:5000	1:10000	1:1000		1:2000	1:1000	1:1000		1:2000
Bac. subtilis (Etr.) Cohn.	1:200000		1:500000	1:10000	1:20000	1:2000		1:5000	1:1000	1:2000		1:5000
Bac. asteris Ver.	1:200000		1:500000	1:10000	1:20000	1:1000	1:2000	1:5000	1:1000	1:1000	1:2000	1:5000
Bac. mesentericus (Fl.)	1:200000		1:500000	1:10000	1:20000	1:2000		1:5000	1:1000	1:1000	1:2000	1:5000
Proteus vulgaris Hauser.	1:100000		1:200000	1:5000	1:10000	1:1000		1:2000	1:1000	1:1000		1:2000

Segue TABELLA I.

MICRORGANISMO	Azzurro bromo-fenolo		Azzurro bromo-timolo		Bruno Bismarck		Cresolftaleina			Fenolftaleina		
	conc. inibente	conc. toller.	conc. inibente	conc. toller.	conc. inibente	conc. toller.	conc. inibente	conc. ad effetto dubbio	conc. toller.	conc. inibente	conc. ad effetto dubbio	conc. toller.
Micrococcus terrestris Ver	1:1000	1:2000	1:1000	1:2000		1:1000	1:1000	1:2000	1:5000	1:1000		1:2000
Sarcina lutea Fl.	1:1000	1:2000	1:2000	1:5000	1:1000	1:2000	1:2000	1:5000	1:10000		1:1000	1:2000
Bact. florescens liq. (Fl.)	1:1000	1:2000	1:1000	1:2000		1:1000	1:1000		1:2000		1:1000	1:2000
Bact. tumefaciens Smith. et Town.	1:1000	1:2000	1:2000	1:5000		1:1000	1:1000		1:2000	1:1000		1:2000
Bact. radicicola Bey.	1:1000	1:2000	1:2000	1:5000		1:1000	1:5000		1:10000	1:5000		1:10000
Bact. pyocyaneum (Fl.)	1:1000	1:2000	1:2000	1:5000		1:1000	1:2000		1:5000	1:2000		1:5000
Bact. coli Esch.	1:1000	1:2000	1:2000	1:5000		1:1000	1:5000		1:10000	1:2000	1:5000	1:10000
Bact. campestre Pammel.		1:1000	1:2000	1:5000		1:1000	1:5000		1:10000	1:1000	1:2000	1:5000
Bact. marginale Brown.	1:1000	1:2000	1:2000	1:5000		1:1000	1:2000		1:5000	1:2000		1:5000
Bact. hyacinthi Wakker.	1:2000	1:5000	1:2000	1:5000	1:1000	1:2000	15000		1:10000	1:5000		1:10000
Bact. vitians Brown.		1:1000	1:2000	1:5000		1:1000	1:2000		1:5000	1:2000		1:5000
Bact. viridolividum Brown	1:1000	1:2000	1:2000	1:5000		1:1000	1:2000		1.5000	1:2000		1:5000
Bac. subtilis (Ehr.) Cohn.	1:1000	1:2000	1:2000	1:5000	1:1000	1:2000	1:5000		1:10000	1:2000	1:5000	1:10000
Bac. asteris Ver.	1:1000	1:2000	1:2000	1:5000	1:1000	1:2000	1:5000		1:10000	1:2000	1:5000	1:10000
Bac. mesentericus (Fl.)	1:1000	1:2000	1:2000	1:5000	1:1000	1:2000	1:5000		1:10000	1:2000	1:5000	1:10000
Proteus vulgaris Hauser.	1:1000	1:2000	1:2000	1:5000	1:1000	1:2000	1:2000	1:5000	1:10000	1:2000		1:5000

TABELLA II. – *Effetti di varie sostanze coloranti sullo sviluppo di Lieviti*

MICRORGANISMO	Rosso Congo			Rosso Carminio		Rosso metile			Rosso Neutro	Rosso fenolo	
	conc. inibente	conc. ad effetto dubbio	conc. tollerata	conc. ad effetto dubbio	conc. tollerata	conc. inibente	conc. ad effetto dubbio	conc. tollerata	conc. tollerata	conc. inibente	conc. tollerata
Sacch. ellipsoideus Hansen			1:1000		1:1000			1:1000	1:1000		1:1000
— *cerevisiae* Hansen			1:1000		1:1000			1:1000	1:1000		1:1000
Zygosacch. felsineus Sacch.	1:1000		1:2000		1:1000	1:1000		1:2000	1:1000	1:1000	1:2000
Kloeckeraspora uvarum Niehaus	1:2000	1:5000	1:10000	1:1000	1:2000	1:2000		1:5000	1:1000	1:1000	1:2000
Hansenula anomala (Hansen)			1:1000		1:1000	1:1000		1:2000	1:1000		1:1000
Torulopsis sp. (susine)			1:1000		1:1000			1:1000	1:1000		1:1000
— *terrestris* Ver.		1:1000	1:2000		1:1000	1:1000	1:2000	1:5000	1:1000	1:1000	1:2000
— *mannitica* Castelli			1:1000		1:1000	1:2000		1:5000	1:1000	1:1000	1:2000
Kloeckera apiculata Reess		1:1000	1:2000	1:1000	1:2000	1:2000		1:5000	1:1000	1:1000	1:2000
Blastodendrion casei Luch.	1:1000		1:2000		1:1000	1:1000		1:2000	1:1000		1:1000
Mycotorula Pinoyi (Cast.)	1:1000		1:2000		1:1000	1:1000	1:2000	1:5000	1:1000		1:1000
— *colostri* Castelli	1:2000		1:5000		1:1000	1:2000		1:5000	1:1000	1:1000	1:2000
Mycotoruloides ovalis L. et T.			1:2000		1:1000	1:1000		1:2000	1:1000		1:1000
Sporobolomyces Shibatanus (Okon.)		1:1000	1:2000		1:1000	1:5000		1:10000	1:1000	1:2000	1:5000

Segue TABELLA II.

MICRORGANISMO	Rosso cresolo			Carminio d'indaco	Fucsina diamante			Eritrosina			Eosina	Safranina	
	conc. inibente	conc. ad effetto dubbio	conc. tollerata	conc. tollerata	conc. inibente	conc. ad effetto dubbio	conc. tollerata	conc. inibente	conc. ad effetto dubbio	conc. tollerata	conc. tollerata	conc. inibente	conc. tollerata
Sacch. ellipsoideus Hansen			1:1000	1:1000			1:1000			1:1000	1:1000		1:1000
— *cerevisiae* Hansen		1:1000	1:2000	1:1000			1:1000			1:1000	1:1000	1:1000	1:2000
Zygosacch. felsineus Sacch.	1:1000	1:2000	1:5000	1:1000	1:1000		1:2000		1:1000	1:2000	1:1000	1:1000	1:2000
Kloeckeraspora uvarum Niehaus	1:1000	1:2000	1:5000	1:1000	1:1000	2:2000	1:5000		1:0000	1:2000	1:1000	1:1000	1:2000
Hansenula anomala (Hansen)	1:1000		1:2000	1:1000			1:1000			1:1000	1:1000		1:1000
Torulopsis sp. (susine)	1:1000		1:2000	1:1000			1:1000			1:1000	1:1000		1:1000
— *terrestris* Ver.	1:1000		1:2000	1:1000		1:1000	1:2000			1:1000	1:1000		1:1000
— *mannitica* Castelli	1:1000		1:2000	1:1000		1:1000	1:2000			1:1000	1:1000		1:1000
Kloeckera apiculata Reess	1:2000		1:5000	1:1000	1:1000	1:2000	1:5000	1:1000	1:2000	1:5000	1:1000	1:1000	1:2000
Blastodendrion casei Luch.	1:1000		1:2000	1:1000	1:1000		1:2000			1:1000	1:1000		1:1000
Mycotorula Pinoyi (Cast.)	1:1000	1:2000	1:5000	1:1000		1:1000	1:2000			1:1000	1:1000		1:1000
— *colostri* Castelli	1:2000		1:5000	1:1000	1:1000	1:2000	1:5000	1:1000	1:2000	1:5000	1:1000	1:2000	1:5000
Mycotoruloides ovalis L. et T.	1:1000		1:2000	1:1000			1:1000			1:1000	1:1000		1:1000
Sporobolomyces Shibatanus (Okon).	1:1000	1:2000	1:5000	1:1000			1:1000			1:1000	1:2000		1:1000

Segue TABELLA II.

MICRORGANISMO	Sudan III	Metilo-range	Porpora bromo-cresolo		Verde brillante			Verde malachite		
	conc. tollerata	conc. tollerata	conc. inibente	conc. tollerata	conc. inibente	conc. ad effetto dubbio	conc. tollerata	conc. inibente	conc. ad effetto dubbio	conc. tollerata
Sacch. ellipsoideus Hansen	1:1000	1:1000	1:1000	1:2000	1:100000		1:200000	1:500000	1:750000	1:1000000
— *cerivisiae* Hansen	1:1000	1:1000	1:1000	1:2000	1:50000		1:100000	1:200000		1:500000
Zygosacch. felsineus Sacch.	1:1000	1:1000	1:5000	1:10000	1:50000		1:100000	1:200000	1:750000	1:1000000
Kloeckeraspora uvarum Niehaus	1:1000	1:1000	1:5000	1:10000	1:50000	1:100000	1:200000	1:200000	1:750000	1:1000000
Hansenula anomala (Hansen)	1:1000	1:1000	1:1000	1:2000	1:20000	1:50000	1:100000	1:200000	1:500000	1:750000
Torulopsis sp. (susine)	1:1000	1:1000	1:1000	1:2000	1:100000	1:200000	1:500000	1:750000	1:1000000	
— *terrestris* Ver.	1:1000	1:1000	1:1000	1:2000	1:200000		1:500000	1:100000	1:200000	1:500000
— *mannitica* Castelli	1:1000	1:1000	1:1000	1:2000	1:100000	1:200000	1:500000	1:100000	1:200000	1:500000
Kloeckera apiculata Reess	1:2000	1:1000	1:2000	1:5000	1:100000		1:200000	1:500000		1:750000
Blastodendrion casei Luch.	1:1000	1:1000	1:1000	1:2000	1:50000		1:100000	1:50000	1:100000	1:200000
Mycotorula Pinoyi (Cast.)	1:1000	1:1000	1:2000	1:5000	1:20000	1:50000	1:100000	1:100000	1:200000	1:500000
— *colostri* Castelli	1:1000	1:1000	1:2000	1:5000	1:100000	1:200000	1:500000	1:750000	1:1000000	
Mycotoruloides ovalis L. et T.	1:0000	1:1000	1:2000	1:5000	1:100000		1:200000	1:100000	1:200000	1:500000
SporobolomycesShibatanus (Okon.).	1:1000	1:1000	1:2000	1:5000	1:100000	1:200000	1:500000	1:200000		1:500000

Segue TABELLA II.

MICRORGANISMO	Verde metile			Violetto di genziana			Violetto dahlia	
	conc. inibente	conc. ad effetto dubbio	conc. tollerata	conc. inibente	conc. ad effetto dubbio	conc. tollerata	conc. inibente	conc. tollerata
Sacch. ellipsoideus Hansen	1:2000		1:5000	1:20000		1:50000	1:1000	1:2000
— *cerevisiae* Hansen	1:1000	1:2000	1:5000	1:100000		1:200000	1:1000	1:2000
Zygosacch. felsineus Sacch.	1:2000		1:5000	1:200000		1:500000	1:2000	1:5000
Kloeckeraspora uvarum Niehaus	1:2000		1:5000	1:100000		1:200000	1:2000	1:5000
Hansenula anomala (Hansen)	1:1000	1:2000	1:5000	1:50000	1:100000	1:200000	1:2000	1:5000
Torulopsis sp. (susine)	1:2000		1:5000	1:20000		1:50000	1:5000	1:10000
— *terrestris* Ver.	1:2000		1:5000	1:100000	1:200000	1:500000	1:5000	1:10000
— *mannitica* Castelli	1:1000	1:2000	1:5000	1:200000		1:500000	1:5000	1:10000
Kloeckera apiculata (Reess)	1:2000		1:5000	1:200000		1:500000	1:5000	1:10000
Blastodendrion casei Luch.	1:1000		1:2000	1:50000	1:100000	1:200000	1:5000	1:10000
Mycotorula Pinoyi (Castelli)	1:2000		1:5000	1:100000		1:200000	1:10000	1:20000
— *colostri* Castelli	1:2000		1:5000	1:100000	1:200000	1:500000	1:10000	1:20000
Mycotoruloides ovalis L. et T.	1:1000	1:2000	1:5000	1:100000	1:200000	1:500000	1:10000	1:20000
SporobolomycesShibatanus(Okon)	1:1000		1:2000	1:50000	1:100000	1:200000	1:5000	1:10000

Segue TABELLA II.

MICRORGANISMO	Bleu metile			Bleu anilina	Bleu timolo			Azzurro bromo-fenolo	
	conc. inibente	conc. ad effetto dubbio	conc. tollerata	conc. tollerata	conc. inibente	conc. ad effetto dubbio	conc. tollerata	conc. inibente	conc. tollerata
Sacch. ellipsoideus Hansen			1:1000	1:1000			1:1000		1:1000
— *cerevisiae* Hansen			1:1000	1:1000			1:1000		1:1000
Zygosacch. felsineus Sacch.	1:1000		1:2000	1:1000	1:1000		1:2000	1:1000	1:2000
Kloeckeraspora uvarum Niehaus	1:1000		1:2000	1:1000	1:1000		1:2000	1:1000	1:2000
Hansenula anomala (Hansen)			1:1000	1:1000		1:1000	1:2000		1:1000
Torulopsis sp. (susine)		1:1000	1:2000	1:1000	1:1000		1:2000		1:1000
— *terrestris* Ver.		1:1000	1:2000	1:1000		1:1000	1:2000		1:1000
— *mannitica* Castelli		1:1000	1:2000	1:1000	1:1000		1:2000		1:1000
Kloeckera apiculata Reess.	1:1000		1:2000	1:1000	1:1000		1:2000	1:1000	1:2000
Blastodendrion casei Luch.		1:1000	1:2000	1:1000		1:1000	1:2000		1:1000
Mycotorula Pinoyi (Cast.)		1:1000	1:2000	1:1000			1:1000		1:1000
— *colostri* Castelli	1:1000		1:2000	1:1000	1:1000		1:2000	1:1000	1:2000
Mycotoruloides ovalis L. et T.		1:1000	1:2000	1:1000	1:1000		1:2000		1:1000
Sporobolomyces Shibatanus (Okon.).		1:1000	1:2000	1:1000		1:1000	1:2000		1:1000

Segue TABELLA II.

MICRORGANISMO	Azzurro bromo-timolo		Bruno Bismarck		Cresolftaleina			Fenolftaleina		
	conc. inibente	conc. tollerata	conc. inibente	conc. tollerante	conc. inibente	conc. ad effetto dubbio	conc. tollerata	conc. inibente	conc. ad effetto dubbio	conc. tollerata
Sacch. ellipsoideus Hansen		1:1000		1:1000	1:1000		1:2000			1:1000
— *cerevisiae* Hansen		1:1000		1:1000	1:1000		1:2000			1:1000
Zygosacch. felsineus Sacch.	1:1000	1:2000	1:1000	1:2000	1:2000		1:5000	1:1000		1:2000
Kloeckeraspora uvarum Niehaus	1:1000	1:2000	1:1000	1:2000	1:2000		1:5000	1:1000	1:2000	1:5000
Hansenula anomala (Hansen).		1:1000		1:1000	1:1000		1:2000		1:1000	1:2000
Torulopsis sp. (susine)	1:1000	1:2000		1:1000	1:1000	1:2000	1:5000			1:1000
— *terrestris* Ver.	1:1000	1:2000		1:1000	1:2000	1:5000	1:10000		1:1000	1:2000
— *mannitica* Castelli	1:1000	1:2000		1:1000	1:2000	1:5000	1:10000		1:1000	1:2000
Kloeckera apiculata Reess	1:1000	1:2000	1:1000	1:2000	1:5000		1.10000	1:1000		1:2000
Blastodendrion casei Luch.	1:1000	1:2000		1:1000	1:2000		1:5000			1:1000
Mycotorula Pinoyi (Cast.)	1:1000	1:2000		1:1000	1:1000		1:2000		1:1000	1:2000
— *colostri* Castelli	1:1000	1:2000		1:1000	1:2000		1:5000	1:1000		1:2000
Mycotoruloides ovalis. L. et T.	1:1000	1:2000		1:1000	1:1000	1:2000	1:5000			1:1000
Sprobolomyces Shibatanus (Okon.).	1:1000	1:2000		1:1000	1:1000		1:2000			1:1000

TABELLA III. – *Effetti di varie sostanze coloranti sullo sviluppo di Funghi.*

MICRORGANISMO	Rosso Congo			Rosso carminio			Rosso metile		
	conc. inibente	conc. ad effetto dubbio	concen. tollerata	concen. inibente	conc. ad effetto dubbio	concen. tollerata	concen. inibente	conc. ad effetto dubbio	concen. tollerata
Aspergillus niger v. Tieghem			1:1000			1:1000	1:2000		1:5000
Acrostalagmus cephalospor. Pey.			1:1000		1:1000	1:2000	1:5000		1:10000
Alternaria tenuis Nees			1:1000			1:1000	1:5000		1:10000
— *fumaginoides* Pey.			1:1000			1:1000	1:5000		1:10000
Botrytis cinerea Pers.			1:1000			1:1000	1:2000	1:5000	1:10000
— *diospiri* Brizi			1:1000			1:1000	1:2000	1:5000	1:10000
Cladosporium herbarum Link			1:1000			1:1000	1:5000		1:10000
Fusarium herbarum (Cda) Fr.			1:1000			1:1000	1:5000		1:10000
— *vasinfectum* Atk		1:1000	1:2000			1:1000	1:5000		1:10000
Macrosporium commune Rab.			1:1000			1:1000	1:5000		1:10000
Microascus cirrosus Czi			1:1000			1:1000	1:2000	1:5000	1:10000
Phoma alternar. Brooks et Searle		1:1000	1:2000			1:1000	1:10000		1:20000
Rhizopus nigricans Ehr.			1:1000			1:1000	1:2000		1:5000
Sclerotium delphinii Welch			1:1000			1:1000	1:5000		1:10000
Scopulariopsis brevic. (Sacc.) Bain			1:1000			1:1000	1:5000		1:10000
Stysanus Stemmonitis (Pers.) Cda			1:1000			1:1000	1:2000	1:5000	1:10000
Synsporium biguttatum Keuss	1:1000		1:2000			1:1000	1:2000	1:5000	1:10000
Trichotecium roseum Link		1:1000	1:2000			1:1000	1:5000		1:10000
Verticillium albo atrum R. et B.		1:2000	1:5000	1:1000	1:2000	1:5000	1:5000	1:10000	1:20000
— *amaranti* Ver.		1:1000	1:2000			1:1000	1:5000		1:10000
— *dahliae* Klebahn	1:2000	1:5000	1:10000			1:1000	1:10000		1:20000
— *ochrorubrum* Desm.			1:1000			1:1000	1:10000		1:20000
— *tracheiphilum* Czi			1:1000			1:1000	1:10000		1:20000

Segue TABELLA III.

MICRORGANISMO	Rosso neutro	Rosso fenolo			Rosso cresolo			Carmin. d'indaco	Fucsina diamante
	concen. tollerata	concen. inibente	conc. ad effetto dubbio	concen. tollerata	concen. inibente	conc. ad effetto dubbio	concen. tollerata	concen. tollerata	concen. tollerata
Aspergillus niger v. Tieghem	1:1000			1:1000	1:1000		1:2000	1:1000	1:1000
Acrostalagmus cephalospor. Pey.	1:1000	1:5000		1:10000	1:5000		1:10000	1:1000	1:1000
Alternaria tenuis Nees.	1:1000	1:1000	1:2000	1:5000	1:1000	1:2000	1:5000	1:1000	1:1000
— *fumaginoides* Pey.	1:1000	1:2000		1:5000	1:5000		1:10000	1:1000	1:1000
Botrytis cinerea Pers.	1:1000			1:1000	1:1000		1:2000	1:1000	1:1000
— *diospiri* Brizi	1:1000			1:1000	1:1000		1:2000	1:1000	1:1000
Cladosporium herbarum Link.	1:1000			1:1000	1:1000		1:2000	1:1000	1:1000
Fusarium herbarum (Cda) Fr.	1:1000	1:2000	1:5000	1:10000	1:2000	1:5000	1:10000	1:1000	1:1000
— *vasinfectum* Atk.	1:1000	1:5000		1:10000	1:5000		1:10000	1:1000	1:1000
Macrosporium commune Rab.	1:1000	1:1000	1:2000	1:5000	1:2000		1:5000	1:1000	1:1000
Microascus cirrosus Czi	1:1000			1:1000	1:1000		1:2000	1:1000	1:1000
Phoma alternar. Brooks et Searle	1:1000	1:1000		1:2000	1:2000		1:5000	1:1000	1:1000
Rhizopus nigricans Ehr.	1:1000			1:1000	1:1000	1:2000	1:5000	1:1000	1:1000
Sclerotium delphinii Welch	1:1000			1:1000	1:1000		1:2000	1:1000	1:1000
Scopulariopsis brevic. (Sacc.) Bain	1:1000	1:1000		1:2000	1:2000		1:5000	1:1000	1:1000
Stysanus Stemmonitis (Pers.) Cda	1:1000	1:2000		1:5000	1:2000		1:5000	1:1000	1:1000
Synsporium biguttatum Preuss	1:1000	1:1000	1:2000	1:5000	1:2000		1:5000	1:1000	1:1000
Trichotecium roseum Link.	1:1000	1:1000	1:2000	1:5000	1:1000	1:2000	1:5000	1:1000	1:1000
Verticillium albo-atrum R. et B.	1:1000	1:10000		1:20000	1:10000		1:20000	1:1000	1:1000
— *amaranti* Ver.	1:1000	1:5000	1:10000	1:20000	1:5000	1:10000	1:20000	1:1000	1:1000
— *dahliae* Klebahn	1:1000	1:10000		1:20000	1:5000	1:10000	1:20000	1:1000	1:1000
— *ochrorubrum* Desm.	1:1000	1:10000		1:20000	1:5000	1:10000	1:20000	1:1000	1:1000
— *tracheiphilum* Czi	1:1000	1:10000		1:20000	1:5000	1:10000	1:20000	1:1000	1:1000

Segue TABELLA III.

MICRORGANISMO	Eritros.	Eosina	Safranina	Sudan III		Metilor.	Porpora bromo - cresolo	
	concen. tollerata	concen. tollerata	concen. tollerata	concen. inibente	concen. tollerata	concen. tollerata	concen. inibente	concen. tollerata
Aspergillus niger v. Tieghem	1:1000	1:1000	1:1000		1:1000	1:1000	1:1000	1:2000
Acrostalagmus cephalospor. Pey.	1:1000	1:1000	1:1000	1:1000	1:2000	1:1000	1:2000	1:5000
Alternaria tenuis Nees	1:1000	1:1000	1:1000		1:1000	1:1000	1:2000	1:5000
— *fumaginoides* Pey.	1:1000	1:1000	1:1000		1:1000	1:1000	1:2000	1:5000
Botrytis cinerea Pers.	1:1000	1:1000	1:1000	1:1000	1:2000	1:1000	1:2000	1:5000
— *diospiri* Brizi	1:1000	1:1000	1:1000	1:1000	1:2000	1:1000	1:2000	1:5000
Cladosporium herbarum Link	1:1000	1:1000	1:1000		1:1000	1:1000	1:2000	1:5000
Fusarium herbarum (Cda) Fr.	1:1000	1:1000	1:1000		1:1000	1:1000	1:2000	1:5000
— *vasinfectum* Atk	1:1000	1:1000	1:1000		1:1000	1:1000	1:2000	1:5000
Macrosporium commune Rab.	1:1000	1:1000	1:1000		1:1000	1:1000	1:2000	1:5000
Microascus cirrosus Czi	1:1000	1:1000	1:1000	1:1000	1:2000	1:1000	1:2000	1:5000
Phoma alternar. Brooks et Searle	1:1000	1:1000	1:1000	1:1000	1:2000	1:1000	1:2000	1:5000
Rhizopus nigricans Ehr.	1:1000	1:1000	1:1000		1:1000	1:1000	1:2000	1:5000
Sclerotium delphinii Welch	1:1000	1:1000	1:1000	1:1000	1:2000	1:1000	1:2000	1:5000
Scopulariopsis brevic. (Sacc.) Bain	1:1000	1:1000	1:1000		1:1000	1:1000	1:2000	1:5000
Stysanus Stemmonitis (Pers.) Cda	1:1000	1:1000	1:1000	1:1000	1:2000	1:1000	1:2000	1:5000
Synsporium biguttatum Keuss	1:1000	1:1000	1:1000		1:1000	1:1000	1:2000	1:5000
Trichotecium roseum Link	1:1000	1:1000	1:1000	1:1000	1:2000	1:1000	1:2000	1:5000
Verticillium albo atrum R. et B.	1:1000	1:1000	1:1000	1:5000	1:10000	1:1000	1:2000	1:5000
— *amaranti* Ver.	1:1000	1:1000	1:1000	1:2000	1:5000	1:1000	1:2000	1:5000
— *dahliae* Klebahn	1:1000	1:1000	1:1000	1:5000	1:10000	1:1000	1:2000	1:5000
— *ochrorubrum* Desm.	1:1000	1:1000	1:1000	1:2000	1:5000	1:1000	1:2000	1:5000
— *tracheiphilum* Czi	1:1000	1:1000	1:1000	1:5000	1:10000	1:1000	1:2000	1:5000

Segue TABELLA III.

MICRORGANISMO	Verde brillante			Verde malachite			Verde metile		
	concen. inibente	conc. ad effetto dubbio	concen. tollerata	concen. inibente	conc. ad effetto dubbio	concen. tollerata	concen. inibente	conc. ad effetto dubbio	concen. tollerata
Aspergillus niger v. Tieghem	1:100000	1:200000	1:500000	1:50000	1:100000	1:200000	1:2000		1:5000
Acrostalagmus cephalospor. Pey.	1:20000	1:50000	1:100000	1:50000	1:100000	1:200000	1:2000	1:5000	1:10000
Alternaria tenuis Nens	1:50000		1:100000	1:100000	1:200000	1:500000	1:2000		1:5000
— *fumaginoides* Pey.	1:50000		1:100000	1:100000	1:200000	1:500000	1:2000	1:5000	1:10000
Botrytis cinerea Pers.	1:50000		1:100000	1:50000	1:100000	1:200000	1:1000	1:2000	1:5000
— *diospiri* Brizi	1:50000		1:100000	1:50000	1:100000	1:200000	1:1000	1:2000	1:5000
Cladosporium herbarum Link	1:50000		1:100000	1:50000	1:100000	1:200000			1:1000
Fusarium herbarum (Cda) Fr.	1:20000	1:50000	1:100000	1:50000		1:100000			1:1000
— *vasinfectum* Atk.	1:50000		1:100000	1:100000		1:200000	1:1000		1:2000
Macrosporium commune Rab.	1:20000	1:50000	1:100000	1:10000	1:20000	1:50000			1:1000
Microascus cirrosus Czi	1:100000		1:200000	1:100000	1:200000	1:500000	1:1000		1:2000
Phoma alternar. Brooks et Scarle	1:100000	1:200000	1:500000	1:50000		1:100000	1:1000	1:2000	1:5000
Rhizopus nigricans Ehr.	1:50000	1:100000	1:200000	1:20000	1:50000	1:100000	1:1000	1:2000	1:5000
Sclerotium dephinii Welch	1:100000		1:200000	1:50000	1:100000	1:200000	1:1000		1:2000
Scopulariopsis brevic. (Sacc.) Bain.	1:100000		1:200000	1:500000	1:750000	1:1000000	1:2000		1:5000
Stysanus Stemmonitis (Pers.) Cda	1:50000		1:100000	1:50000		1:100000	1:1000	1:2000	1:5000
Synsporium biguttatum Preuss	1:50000	1:100000	1:200000	1:50000	1:100000	1:200000	1:1000	1:2000	1:5000
Trichotecium roseum Link	1:100000	1:200000	1:500000	1:50000	1:100000	1:200000	1:2000		1:5000
Verticillium albo-atrum R. et B.	1:100000	1:200000	1:500000	1:200000	1:500000	1:750000	1:2000	1:5000	1:10000
— *amaranti* Ver.	1:100000	1:200000	1:500000	1:200000	1:500000	1:750000	1:2000	1:5000	1:10000
— *dahliae* Klebahn	1:200000	1:500000	1:750000	1:200000	1:500000	1:750000	1:5000		1:10000
— *ochrorubrum* Desm.	1:200000		1:500000	1:750000		1:1000000	1:2000	1:5000	1:10000
— *tracheiphilum*	1:100000	1:200000	1:500000	1:200000	1:500000	1:750000	1:5000		1:10000

Segue TABELLA III.

MICRORGANISMO	Violetto genziana			Violetto dahlia			Bleu metile		
	concen. inibente	conc. ad effetto dubbio	concen. tollerata	concen. inibente	conc. ad effetto dubbio	concen. tollerata	concen. inibente	conc. ad effetto dubbio	concen. tollerata
Aspergillus niger v. Tieghem	1:20000	1:50000	1:100000	1:1000	1:2000	1:5000			1:1000
Acrostalagmus cephalospor. Pey.	1:5000	1:10000	1:20000		1:1000	1:2000	1:1000		1:2000
Alternaria tenuis Nees.	1:20000	1:50000	1:100000	1:5000		1:10000	1:1000	1:2000	1:5000
— *fumaginoides* Pey.	1:50000		1:100000	1:5000		1:10000	1:1000	1:2000	1:5000
Botrytis cinerea Pers.	1:20000	1:50000	1:100000		1:1000	1:2000	1:1000		1:2000
— *diospiri* Brizi	1:20000	1:50000	1:100000		1:1000	1:2000	1:1000		1:2000
Cladosporium herbarum Link.	1:20000		1:50000	1:2000		1:5000	1:1000		1:2000
Fusarium herbarum (Cda) Fr.	1:20000		1:50000	1:2000		1:5000	1:1000		1:2000
— *vasinfectum* Atk.	1:50000		1:100000	1:2000		1:5000	1:1000	1:2000	1:5000
Macrosporium commune Rab.	1:20000		1:50000	1:1000		1:2000		1:1000	1:2000
Microascus cirrosus Czi	1:20000		1:50000	1:2000		1:5000	1:1000		1:2000
Phoma alternar. Brooks et Searle	1:20000		1:50000	1:5000		1:10000			1:1000
Rhizopus nigricans Ehr.	1:20000	1:50000	1:100000	1:2000		1:5000		1:1000	1:2000
Sclerotium delphinii Welch	1:20000		1:50000	1:1000		1:2000		1:1000	1:2000
Scopulariopsis brevic. (Sacc.) Bain	1:50000	1:100000	1:200000	1:2000		1:5000	1:1000	1:2000	1:5000
Stysanus Stemmonitis (Pers.) Cda	1:20000	1:50000	1:100000	1:2000	1:5000	1:10000	1:1000	1:2000	1:5000
Synsporium biguttatum Preuss	1:20000		1:50000	1:2000	1:5000	1:10000	1:1000	1:2000	1:5000
Trichotecium roseum Link.	1:20000		1:50000	1:2000		1:5000	1:1000		1:2000
Verticillium albo atrum R. et B.	1:50000	1:100000	1:200000	1:2000	1:5000	1:10000	1:1000	1:2000	1:5000
— *amaranti* Ver.	1:50000	1:10000	1:20000	1:2000	1:5000	1:10000	1:1000	1:2000	1:5000
— *dahliae* Klebahn	1:010000		1:200000	1:2000	1:5000	1:10000	1:1000	1:2000	1:5000
— *ochrorubrum* Desm.	1:50000		1:100000	1:2000	1:5000	1:10000	1:1000	1:2000	1:5000
— *tracheiphilum* Czi	1:20000	1:50000	1:100000	1:2000	1:5000	1:10000	1:1000	1:2000	1:5000

Segue TABELLA III.

MICRORGANISMO	Bleu anilina	Bleu timolo			Azzurro bromo-fenolo			Azzurro bromo-timolo		
	concen. tollerata	conc. inibente	conc. ad effetto dubbio	conc. tollerata	conc. inibente	conc. ad effetto dubbio	conc. tollerata	conc. inibente	conc. ad effetto dubbio	conc. tollerata
Aspergillus niger v. Tieghem	1:1000	1:1000		1:2000		1:1000	1:2000		1:1000	1:2000
Acrostalagmus cephalospor. Pey	1:1000	1:1000	1:2000	1:5000	1:2000		1:5000	1:1000	1:2000	1:5000
Alternaria tenuis Nees	1:1000	1:1000	1:2000	1:5000	1:2000		1:5000	1:2000		1:5000
- *fumaginoides* Pey.	1:1000	1:1000	1:2000	1:5000	1:2000		1:5000	1:2000		1:5000
Botrytis cinerea Pers.	1:1000	1:2000		1:5000	1:2000		1:5000	1:2000		1:5000
— *diospiri* Brizi	1:1000	1:2000		1:5000	1:2000		1:5000	1:2000		1:5000
Cladosporium herbarum Link	1:1000	1:2000	1:5000	1:10000	1:2000		1:5000	1:2000		1:5000
Fusarium herbarum (Cda) Fr.	1:1000	1:2000		1:5000	1:1000		1:2000	1:1000	1:2000	1:5000
— *vasinfectum* Atk.	1:1000	1:2000		1:5000	1:1000		1:2000	1:2000		1:5000
Macrosporium commune Rab.	1:1000	1:2000	1:5000	1:10000	1:2000		1:5000	1:1000		1:2000
Microascus cirrosus Czi	1:1000	1:2000		1:5000	1:1000	1:2000	1:5000	1:2000		1:5000
Phoma alternar. Brooks et Searle	1:1000	1:1000		1:2000	1:1000		1:2000	1:1000		1:2000
Rhizopus nigricans Ehr.	1:1000	1:2000		1:5000	1:1000		1:2000	1:1000		1:2000
Sclerotium dephinii Welch	1:1000	1:2000		1:5000	1:2000		1:5000	1:2000		1:5000
Scopulariopsis brevic. (Sacc.) Bain.	1:1000	1:2000		1:5000	1:2000		1:5000	1:2000		1:5000
Stysanus Stemmonitis (Pers.) Cda	1:1000	1:1000	1:2000	1:5000	1:1000		1:2000	1:2000		1:5000
Synsporium biguttatum Preuss	1:1000	1:1000	1:2000	1:5000	1:2000		1:5000	1:1000	1:2000	1:5000
Trichotecium roseum Link	1:1000	1:2000		1:5000	1:2000		1:5000	1:2000		1:5000
Verticillium albo-atrum R. et B.	1:1000	1:2000		1:5000	1:2000		1:5000	1:2000		1:5000
— *amaranti* Ver.	1:1000	1:2000		1:5000	1:2000		1:5000	1:2000		1:5000
— *dahliae* Klebahn	1:1000	1:2000		1:5000	1:2000		1:5000	1:2000		1:5000
— *ochrorubrum* Desm.	1:1000	1:2000		1:5000	1:2000		1:5000	1:2000		1:5000
— *tracheiphilum* Czi.	1:1000	1:2000		1:5000	1:1000	1:2000	1:5000	1:1000	1:2000	1:5000

Segue TABELLA III.

MICRORGANISMO	Bruno Bismarck			Cresolftaleina			Fenolftaleina		
	concen. inibente	conc. ad effetto dubbio	concen. tollerata	concen. inibente	conc. ad effetto dubbio	concen. tollerata	concen. inibente	conc. ad effetto dubbio	concen. tollerata
Aspergillus niger v. Tieghem			1:1000	1:2000	1:5000	1:10000	1:2000		1:5000
Acrostalagmus cephalospor. Pey		1:1000	1:2000	1:5000	1:10000	1:20000	1:5000		1:10000
Alternaria tenuis Nees		1:1000	1:2000	1:5000		1:10000	1:2000	1:5000	1:10000
- *fumaginoides* Pey.	1:1000		1:2000	1:5000		1:10000	1:2000	1:5000	1:10000
Botrytis cinerea Pers.			1:1000	1:5000	1:10000	1:20000	1:5000	1:10000	1:20000
— *diospiri* Brizi			1:1000	1:5000	1:10000	1:20000	1:5000	1:10000	1:20000
Cladosporium herbarum Link			1:1000	1:5000		1:10000	1:2000	1:5000	1:10000
Fusarium herbarum (Cda) Fr.			1:1000	1:5000		1:10000	1:5000		1:10000
— *vasinfectum* Atk.			1:1000	1:5000	1:10000	1:20000	1:5000		1:10000
Macrosporium commune Rab.			1:1000	1:2000	1:5000	1:10000	1:5000		1:10000
Microascus cirrosus Czi	1:1000	1:2000	1:5000	1:10000		1:20000	1:5000		1:10000
Phoma alternar. Brooks et Searle		1:1000	1:2000	1:5000		1:10000	1:2000	1:5000	1:10000
Rhizopus nigricans Ehr.			1:1000	1:5000	1:10000	1:20000	1:1000	1:2000	1:5000
Sclerotium dephinii Welch		1:1000	1:2000	1:10000		1:20000	1:5000		1:10000
Scopulariopsis brevic. (Sacc.) Bain.	1:1000	1:2000	1:5000	1:10000		1:20000	1:5000		1:10000
Stysanus Stemmonitis (Pers.) Cda		1:1000	1:2000	1:5000		1:10000	1:2000	1:5000	1:10000
Synsporium biguttatum Preuss			1:1000	1:5000		1:10000	1:5000		1:10000
Trichotecium roseum Link			1:1000	1:10000		1:20000	1:2000	1:5000	1:10000
Verticillium albo-atrum R. et B.	1:1000		1:2000	1:10000	1:20000	1:50000	1:10000		1:20000
— *amaranti* Ver.	1:1000	1:2000	1:5000	1:5000	1:10000	1:20000	1:2000	1:5000	1:10000
— *dahliae* Klebahn	1:5000		1:10000	1:20000		1:50000	1:10000		1:20000
— *ochrorubrum* Desm.	1:5000		1:10000	1:10000		1:20000	1:2000	1:5000	1:10000
— *tracheiphilum* Czi.	1:2000	1:5000	1:10000	1:10000	1:20000	1:50000	1:10000		1:20000

L'effetto massimo è stato ragggiunto con verde malachite a cui fa seguito il verde brillante e, talvolta, il violetto di genziana.

Nessun diretto rapporto sembra esistere tra potere batteriostatico e composizione e struttura molecolare delle sostanze considerate.

Il numero dei microrganismi sui quali i coloranti si sono fatti agire, pur non essendo trascurabile non è tale da permettere una generalizzazione dei risultati circa la tollerabilità, maggiore, o minore, dei diversi gruppi sistematici, Schizomiceti, Lieviti, Funghi.

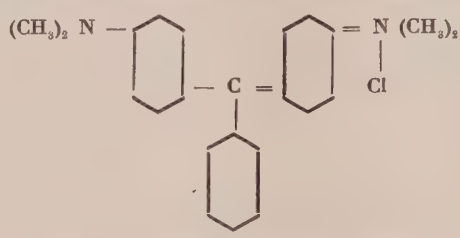
II – In particolare: il verde malachite.

Precedente sperimentazione.

Anteriori, sia pur scarse, segnalazioni confermate dalle prove innanzi riferite ci hanno indicato essere il verde malachite una delle sostanze coloranti avente rispetto alle altre più elevato potere inibitorio dello sviluppo microbico.

Scoperto nel 1877 da O. Fischer esso fa parte del gruppo del diamidotrifenilmetano, composto dal quale si ottengono per sostituzione dell'H amidico con gruppi metilici, etilici, benzilici, ecc., varie sostanze coloranti.

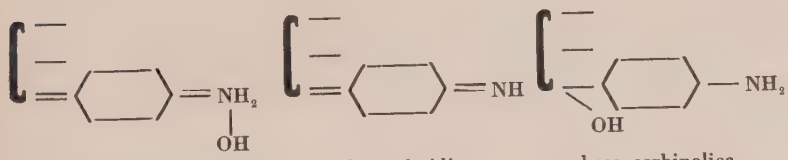
Così, il verde malachite è un derivato del tetrametildiamidotrifenilcarbinolo; e, come cloridrato, corrisponde alla formula:



cloruro di tetrametilamidofucsonimonio

I derivati del diamidotrifenilmetano sono, in genere, tutti basici e possono per solfonazione venire trasformati in coloranti acidi.

Per aggiunta di alcali si ha formazione della base ammonica la quale passa, per separazione di acqua, alla base imidica solubile in etere, colorata, ma trasformabile facilmente in base carbinolica incolora per addizione di acqua e trasposizione:



base ammonica base imidica base carbinolica

Alle basi carbinoliche corrispondono infine le basi aminiche che si ottengono mediante decomposizione dei coloranti del trifenilmetano con ammoniaca.

Il potere antimicrobico del verde malachite è noto dagli studi di diversi autori tra i quali Kligler, Gay e Morrison, Schiemann, e Baumgarten ([22]), Leonian, Dessy, Boudru, Bennet ([23]) Munro e Newton ([24]), Verona e Ceccarelli.

Kligler trovò che lo sviluppo di *Staphylococcus aureus* viene inibito da una concentrazione di 1 : 300000, di *Bac. subtilis* di 1 : 4000000; mentre per *Bact. coli* occorrerebbe una diluizione di 1 : 40000, per i b. del tifo di 1 : 30000 e della dissenteria tra 1:250-500000. Gay e Morrison lo accertarono tossico nella diluizione di 1 : 2000000 su gli streptococchi, di 1 : 20000 su gli stafilococchi, di 1 : 2000 sui b. del tifo.

Altre specie batteriche furono sperimentate da Schiemann e Baumgarten.

Sui funghi fu sperimentato da Leonian che lo accertò tossico su *Fusarium* sp. a 1 : 500000 e su numerose specie di *Phytophthora* alcune delle quali sensibili anche alla diluizione di 1 : 16000000, da Dessy su di alcuni *Mucor* a 1 : 40000; da Boudru su *Ceratostomella ulmi* a 1 : 2000000 ; da Bennet contro *Fus. nivale (Calonectria graminicola)* a 1 : 20000, da Munro e Newton su *Fus. culmorum, Phythium ultimum, Rhizoctonia solani*; da Verona e Ceccarelli su *Verticillium albo-atrum, Vert. dahliae, V. tracheiphilum, Vert. amaranti* e *Acrostalagmus cephalosporioides.*

Dato sì forte potere antimicrobico il verde malachite ha trovato qualche impiego nella tecnica batteriologica: così Loeffler ([25]) lo introdusse nei mezzi di arricchimento per le colture dei b. del tifo; Petragnani per l' isolamento del germe tubercoligeno; mentre

ZOVAGLI ([26]), non è molto, ne proponeva l'uso nei substrati atti a determinare il colititolo del latte.

In terapia animale non ci consta che abbia impiego. In fitoterapia si è avuto qualche tentativo di applicazione invero con risultati, non ben netti e in prove poco numerose.

Esperienze in questo senso furono eseguite da BENNETT che usò verde malachite unito alla poltiglia bordolese per combattere attacchi di *Fusarium nivale* su graminacee spontanee dei generi *Agrostis, Poa, Festuca, Lolium;* da TRUFFAUT e POSTAC ([27]) che qualche risultato ottennero contro la peronospora della vite; da MUNERATI ([28]) che scarso effetto registrò nella lotta contro la *Cercospora beticola.*

IL POTERE ANTIMICROBICO DEL VERDE MALACHITE

a) - *Esperienze con colture brute.*

Questo primo gruppo di ricerche può dirsi orientativo, di massima. All'uopo abbiamo allestito piastre insemenzate con acqua o con terra usando agar-fagiuoli addizionato o meno con quantità diverse di verde malachite.

Coltivato a 28°C fu proceduto alla conta delle colonie dopo 20 giorni. I risultati sono riportati nelle Tab. IV e V e tradotti nei grafici delle figg. 1 e 2.

TAB. IV – Numero delle colonie sviluppatesi nelle piastre dopo 20 giorni di coltura a 28°C. Materiale di innesto cc. 0,2 di acqua di condottura

	n° delle colonie per piastra			
	Esp. I	Esp. II	Esp. III	Media
Agar-fagiuoli normale	445	510	482	479
id. + v. m. 1 : 10000	16	9	3	9
id. + v. m. 1 : 20000	7	19	15	14
id. + v. m. 1 : 50000	180	173	160	171
id. + v. m: 1 : 100000	190	201	196	196
id. + v. m. 1 : 200000	260	284	291	278
id. + v. m. 1 : 500000	320	345	317	327

Tab. V – Id. come tab. IV – Materiale d'innesto cc. 0,1 di gr. 1 di terra in cc. 1000 di acqua sterile.

	n° delle colonie per piastra			
	Esp. I	Esp. II	Esp III	Media
Agar-fagiuoli normale	612	705	587	635
id. + v. m. 1 : 10000	2	—	12	5
id. + v. m. 1 : 20000	21	7	16	15
id. + v. m. 1 : 50000	191	150	144	162
id. + v. m. 1 : 100000	253	208	222	228
id. + v. m. 1 : 200000	349	332	311	331
id. + v. m. 1 : 500000	477	516	438	477

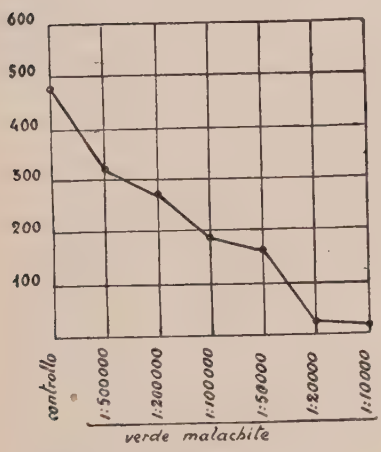


Fig. 1 – Grafico relativo ai dati della Tab. IV

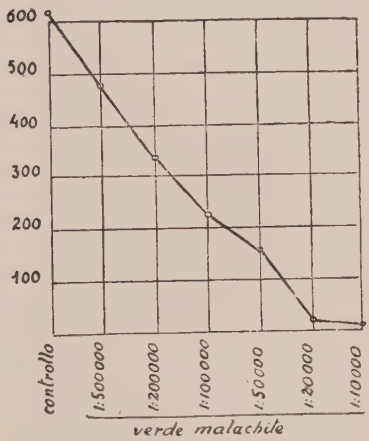


Fig. 2 – Grafico relativo ai dati della Tabella V

Queste prove indicano chiaramente l'azione ostacolante lo sviluppo dei microbi del verde malachite capace di influire anche in concentrazioni debolissime quale quella pari ad 1 : 500000.

b) *Esperienze con colture pure.*

Risultati non diversi da quelli precedentemente esposti si sono

TAB. VI – Influenza del verde malachite sullo sviluppo di Schizomiceti

Microrganismo	concentrazioni										
	1:1000	1:2000	1:5000	1:10000	1:20000	1:50000	1:100000	1:200000	1:500000	1:750000	1:1000000
1 *Micrococcus terrestris* Ver. . .	—	—	—	—	(+)	+	+	+	+	+	+
2 *Brucella melitensis* (Bruce) Meyer et Shaw	—	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3 *Sarcina lutea* (Fl.)	—	—	—	(+)	+	+	+	+	+	+	+
4 *Bact. coli* Esch.	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
5 *Bact. tumfaciens* Smith et Thow	—	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6 – *fl. liquefaciens* (Fl.) L. et N.	—	—	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+
7 – *radicicola* Bey	—	—	—	—	(+)	+	+	+	+	+	+
8 – *pyocyaneum* (Fl.) . . .	—	—	—	(+)	+	+	+	+	+	+	+
9 – *campestre* Pammel . .	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
10 – *hyacinthi* Wakker . .	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
11 – *marginale* Brown . . .	—	—	—	—	—	(+)	+	+	+	+	+
12 – *vitians* Brown	—	—	—	—	(+)	+	+	+	+	+	+
13 – *viridilividum* Brown . .	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
14 – Paratifo B.	—	—	—	—	—	—	—	(+)	+	+	+
15 – *Proteus vulgaris* Hauser .	—	—	—	—	—	—	(+)	+	+	+	+
16 *Bac. mesentericus* (Fl.) . .	—	—	—	—	—	—	—	—	(+)	+	+
17 – *mycoides* Fl.	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+
18 – *subtilis* (Ehr.) Cohn . .	—	—	—	—	—	—	—	—	(+)	+	+
19 – *asteris* Ver.	—	—	—	—	—	—	—	—	(+)	+	+
20 *Actinomyces* sp. (n. 2 di collez.)	—	—	—	—	—	(+)	+	+	+	+	+
21 – sp. (n. 3 di collez.)	—	—	—	(+)	+	+	+	+	+	+	+

N. B. – I segni indicano: + sviluppo positivo; — sviluppo negativo; (+) sviluppo dubbio o scarso.

conseguiti (v. tab. *VI, VII, VIII)* sperimentando con colture pure. I dati di queste tabelle si collegano con quelli delle tab. *I, II, III* e sono stati ottenuti adottando uguale tecnica (pag. 425).

Tab. VII – Influenza del verde malachite sullo sviluppo di Lieviti

Microrganismo	concentrazioni										
	1:1000	1:2000	1:5000	1:10000	1:20000	1:50000	1:100000	1:200000	1:500000	1:750000	1:1000000
1 *Torulopsis* sp. (alba) . . .	—	—	—	—	—	—	—	(+)	+	+	+
2 – sp. (da susine) . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	(+)
3 – *terrestris* Ver. . .	—	—	—	—	—	—	—	(+)	+	+	+
4 – *mannitica* Castelli	—	—	—	—	—	—	—	(+)	+	+	+
5 *Kloeckera apiculata* (Reess) .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
6 *Blastodendrion casei* Luchetti	—	—	—	—	—	—	(+)	+	+	+	+
7 *Mycotorula* sp. (E, da feci) .	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
8 – sp. (G, da feci) .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
9 – *Pinoyi* (Cast.) . .	—	—	—	—	—	—	—	(+)	+	+	+
10 – *colostri* Castelli .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	(+)
11 *Mycotorul. ovalis* Lang. et Tal.	—	—	—	—	—	—	—	(+)	+	+	+
12 *Sacch. cerevisiae* Hansen . .	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+
13 – *ellipsoideus* Hansen . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	(+)	+
14 *Kloeckeraspora uvarum* Niehaus	—	—	—	—	—	—	—	—	—	(+)	+
15 *Hansenula anomala* (Hansen)	—	—	—	—	—	—	—	—	(+)	(+)	—
16 *Zygosacch. felsineus* Sacchetti .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	(+)	+
16 *Sporobolomyces Shibatanus* (Okonuki)	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+

N. B. – Per i segni come in tabella VI.

Tab. VIII – Influenza del verde malachite sullo sviluppo di Funghi.

Microrganismo	concentrazioni										
	1:1000	1:2000	1:5000	1:10000	1:20000	1:50000	1:100000	1:200000	1:500000	1:750000	1:1000000
1 *Acrostalagmus cephalosp.* Pey.	—	—	—	—	—	—	(+)	+	+	+	+
2 *Alternaria fumaginoides* Pey.	—	—	—	—	—	—	—	(+)	+	+	+
3 – *tenuis* Nees . . .	—	—	—	—	—	—	—	(+)	+	+	+
4 *Aspergillus niger* v. Tieghem.	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
5 – sp. (n. 1 di collez.)	—	—	—	—	—	—	—	(+)	+	+	+
6 – – (n. 2 di collez.)	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+
7 – – (n. 4 di collez.)	—	—	—	—	—	—	—	(+)	+	+	+
8 *Botrytis cinerea* Pers. . . .	—	—	—	—	—	—	(+)	+	+	+	+
9 – *diospirii* Brizi . . .	—	—	—	—	—	—	(+)	+	+	+	+
10 *Cephal. subvert.* Schultz et Sacc.	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
11 *Cladosporium herbarum* Link .	—	—	—	—	—	—	(+)	+	+	+	+
12 – sp.	—	—	—	—	—	—	—	—	(+)	+	+
13 *Corticium Rolsfii* (Sacc.) Czi .	—	—	—	—	—	—	(+)	+	+	+	+
14 *Fusarium herbarum* (Cda) Fr. .	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
15 – *vasinfectum* Atk. .	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+
16 *Macrosporium commune* Rab. .	—	—	—	—	(+)	+	+	+	+	+	+
17 *Microascus cirrosus* Czi . . .	—	—	—	—	—	—	—	(+)	+	+	+
18 *Penicillium* sp. (n. 1 di collez.)	—	—	—	—	—	—	(+)	+	+	+	+
19 *Rizoctonia mucoroides* . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	(+)	+	+
20 *Rhizopus nigricans* Ehr. . .	—	—	—	—	—	(+)	+	+	+	+	+
21 *Sclerotium delphinii* Welch. .	—	—	—	—	—	—	(+)	+	+	+	+
22 – *oryzae* Catt. . . .	—	—	—	—	—	—	(+)	+	+	+	+
23 *Scopular. brevic.* (Sacc.) Bain. .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	(+)	+
24 *Stysanus Stemmonitis* (Pers.) Cda	—	—	—	—	—	(+)	+	+	+	+	+
25 *Synsporium biguttatum* Preuss.	—	—	—	—	—	—	(+)	+	+	+	+
26 *Trichotecium roseum* Linck . .	—	—	—	—	—	—	(+)	+	+	+	+
27 *Verticill. albo-atrum* R. et B. .	—	—	—	—	—	—	—	—	(+)	+	+
28 – *amaranti* Ver. . .	—	—	—	—	—	—	—	—	(+)	+	+
29 – *dahliae* Klebahn . .	—	—	—	—	—	—	—	—	(+)	+	+
30 – *ochrorubrum* Desm. .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
31 – *tracheiphilum* Czi .	—	—	—	—	—	—	—	—	(+)	+	+
32 *Zithia terricola* Ver.	—	—	—	—	—	—	(+)	+	+	+	+

N. B. – Per i segni come in tabella VI.

Dei tre gruppi di germi – Schizomiceti, Lieviti, Funghi – i più resistenti, in linea di massima, si sarebbero dimostrati i primi ai quali fanno seguito i Funghi a micelio, indi i Lieviti.

Relativamente alle specie sperimentate si possono infatti stabilire le seguenti percentuali di sviluppo :

TAB. IX. – Percentuali di sviluppo delle specie in esperimento (Tab. VI-VIII) in presenza di verde malachite.

Microrganismi	concentrazioni										
	1:1000	1:2000	1:5000	1:10000	1:20000	1:50000	1:100000	1:200000	1:500000	1:750000	1:1000000
Schizomiceti	—	10	14	30	43	67	76	81	100	100	100
Lieviti	—	—	—	—	—	—	12	41	59	88	100
Funghi	—	—	—	—	3	9	51	75	93	99	100

Tra gli Schizomiceti notevole la resistenza di *Brucella melitensis* (BRUCE) MEYER et SHAW, *Bact. tumefaciens* SMITH et THOW. *Bact. fluorescens liquefaciens* (Fl.) L. et N., *Bact. pyocyaneum* (Fl.) L. et N.

c) *Esperienze su spore di Carie e Carbone.*

Più da vicino doveva riguardarci il comportamento di fronte al verde malachite delle spore di Carie e di Carboni poichè è da tali prove che doveva sorgere un qualche suggerimento circa eventuali applicazioni nei trattamenti di disinfezione dei semi.

Per queste prove ci siamo valsi di materiale in parte (Carboni) da noi raccolto nella precedente o attuale annata, in parte (Carie) fattoci inviare da altri Laboratori di Fitopatologia (*).

(*) – Particolarmente, dobbiamo ringraziare il chiaro Prof. O. MUNERATI per averci gentilmente fornito spighe cariate per *Tilletia laevis* e *T. caries*.

Le esperienze sono state condotte seguendo due vie.

In un primo tempo, cioè, abbiamo posto a germinare in goccia pendente le spore di Carie e di Carboni in presenza di verde malachite aggiunto, nelle fissate proporzioni, ad una soluzione 0,5 % di glucosio.

Le osservazioni periodicamente ripetute, furono protratte fino al 15° giorno conseguendosene i risultati della Tab. X.

TAB. X - Germinazione di spore di Carie e Carboni in presenza di verde malachite.

	Controllo	verde malachite			
		1:10000	1:50000	1:100000	1:200000
Utilago tritici	abbondante	nulla	nulla	nulla	scarsissima
– *maydis*	"	"	"	"	"
Tilletia laevis	"	"	"	"	"
– *caries*	"	"	"	"	"

La presenza del verde malachite nella concentrazione, per lo meno, di 1 : 100000 ostacola la germinazione delle spore delle carie e dei carboni sperimentati.

Per il secondo gruppo di prove si è seguito il procedimento di E. RIEHM quale è adottato per la determinazione dell'efficacia degli anticrittogamici dall'Istituto Biologico di Stato di Berlino-Dahlem. Cioè, le spore di Carie o di Carbone, furono distese in sottile strato in coni di carta bibula immersi in parte in bacinelle contenenti le soluzioni del composto. Dopo i vari tempi di immersione vennero lavate con acqua e trasportate in goccia pendente coltivando in soluz. 0,5 % di glucosio a 24°C. Il controllo della germinazione venne eseguito dopo ore 3-6-12-48 e ripetuto al 7° giorno.

In presenza di verde malachite la germinazione di spore di Carie e Carboni è manifestamente ostacolata. Il semplice contatto, però, anche prolungando per 3 ore non sorte risultati ben netti e non impedisce sempre del tutto la germinazione.

TAB. XI – Germinazione di spore di *Ustilago tritici.*

Durata del trattamento	controllo (immersione in acqua)	verde malachite (immersione in v. m. nelle concentrazioni di)		
		1:10000	1:50000	1:100000
30′	abbondante	mediocre	mediocre	discreta
1h	„	„	„	mediocre
2h	„	scarsissima	„	„
3h	„	nulla	scarsissima	scarsa

TAB. XII – Germinazione di spore di *Ustilago maydis.*

30′	abbondante	mediocre	mediocre	discreta
1h	„	scarsa	scarsa	mediocre
2h	„	nulla	scarsissima	scarsa
3h	„	„	nulla	„

TAB. XIII – Germinazione di spore di *Tilletia laevis.*

30′	abbondante	mediocre	mediocre	discreta
1h	„	„	„	mediocre
2h	„	„	„	scarsa
3h	„	scarsissima	scarsa	„

TAB. XIV – Germinazione di spore di *Tilletia caries.*

30′	abbondante	mediocre	mediocre	discreta
1h	„	„	„	mediocre
2h	„	scarsissima	„	scarsa
3h	„	nulla	scarsa	scarsissima

d) *Esperienze sullo sviluppo di zoospore di "Plasmopara viticola"*

Già da quando venimmo nella determinazione di sperimentare l'uso del verde malachite come anticrittogamico, oltre che al suo impiego nella concia dei cereali, pensammo all' eventuale impiego contro la Peronospora della Vite o di altre piante coltivate.

Della sua efficacia o meno ci avrebbero dovuto illuminare i risultati seguenti ai trattamenti alle piante. Tuttavia, a corredo delle esperienze di campo e come guida alle medesime, si volle istituire una serie di prove per stabilire, di fronte al composto, il comportamento dei conidi di *Plasmopara viticola* avuto riguardo alla loro germinazione e formazione di zoospore.

Si operò in modo semplice. Raccolte foglie peronosporate furono messe in camera umida a 24° C. mantenendovele per due giorni allo scopo di far raggiungere ai conidi la loro maturità fisiologica.

Indi si fecero preparati di conidi montandoli in goccia pendente di acqua distillata o di soluzione di verde malachite in varie concentrazioni. I vetrini furono mantenuti all' oscuro e alla temperatura di 18°-24° C. osservandoli periodicamente di due in due ore.

In acqua distillata lo sviluppo delle zoospore fu piuttosto pronto ed abbondante. In soluzioni di verde malachite nelle concentrazioni di 1:10000 - 1:25000 - 1:50000 - 1:100000, non si notò, anche trascorse molte ore, alcuna formazione di zoospore.

Influenza del v. m. sulla germinazione dei semi

Necessario o per lo meno opportuno complemento delle prove in precedenza eseguite sulla germinazione di spore di Carie e Carboni si é creduto fosse d'indagare l' influenza del verde malachite sulla germinazione dei semi.

Tali prove potevano essere limitate al frumento o ai cereali essendo questi i semi che generalmente vengono trattati. Le abbiamo tuttavia estese a qualche leguminosa, sia per formarci un giudizio più completo degli effetti del trattamento sulla germinazione dei semi, sia perchè non sarebbe stato fuori luogo d' estendere i trattamenti stessi ai semi di leguminose essendosi dimostrato, anche su queste piante, la loro favorevole azione contro le muffe capaci di attaccare l' embrione nei primi giorni di vita.

La semplicità di queste prove ci dispensa dal fissare le modalità sperimentali seguite e che sono quelle generalmente in uso.

I risultati sono consegnati nella Tab. XV.

Tali risultati dimostrano che in conseguenza dei trattamenti i semi non subiscono danno anche per immersioni prolungate (6 ore) e concentrazioni forti (1:10000). Inoltre indicano che il verde malachite non sembra esplicare alcun effetto stimolante sull' attività germinativa quale invece avrebbero alcuni composti commerciali di natura inorganica.

Influenza del verde malachite sullo sviluppo delle piante.

Stabilita la nessuna influenza del verde malachite sulla germinazione dei semi volemmo provare se, per contro, una qualche azione il composto avesse sullo sviluppo della pianta in vista anche di alcuni tentativi di chemioterapia interna dei quali in appresso sarà riferito.

Le esperienze eseguite al riguardo furono piuttosto numerose, e lungo sarebbe riferirne con dettaglio. Ritenendolo anche superfluo ci limitiamo ad esporle sinteticamente.

Le piante con le quali sperimentammo furono diverse: frumento, mais, fagiuoli, fava, ricino, giacinti, tulipani. Di ogni pianta furono allestite colture in terra e colture in soluz. acquosa (liquido di Knop); in ogni caso la somministrazione del verde malachite venne effettuata in varie concentrazioni e in due momenti diversi. Ossia, per questi ultimi, si provò prima a somministrare il composto a piantine da poco germinate, mentre in un secondo gruppo di prove la somministrazione venne effettuata a piantine già abbastanza sviluppate.

In ogni caso i risultati furono positivi nel senso che si verificò un arresto di sviluppo dell' apparato radicale con conseguenti disturbi nell' assorbimento e, quindi, nel trofismo.

Nelle piante a bulbo nonostante il mancato sviluppo radicale – la fig. 3 ne dà un esempio – si raggiunse ugualmente la fioritura, sia pure più tardi che nei controlli; ma essa, come lo sviluppo fogliaceo, avvenne a spese delle riserve contenute nel bulbo.

Nelle altre piante lo sviluppo proseguì solo fino ad esaurimento delle riserve del seme.

Tab. XV – Influenza del verde malachite sulla germinazione dei semi

	durata dell' immersione														
	1 ora					2 ore					6 ore				
	in acqua (contr.)	in verde malachite				in acqua (contr.)	in verde malachite				in acqua (contr.)	in verde malachite			
		1: 10000	1: 50000	1: 100000	1: 250000		1: 10000	1: 50000	1: 100000	1: 250000		1: 10000	1: 50000	1: 100000	1: 250000
A) – Frumento (Temp. di germinazione 22°C.).															
al 2° g. germinati %	32	38	32	34	32	66	72	64	68	65	68	62	56	71	72
„ 3° g. „ „	68	70	66	68	70	92	94	94	92	91	92	86	86	84	88
„ 4° g. „ „	94	90	88	92	93	94	94	94	94	93	94	94	92	93	94
„ 5° g. „ „	94	92	95	94	95	94	94	94	94	94	94	95	94	94	95
„ 6° g. „ „	94	92	95	94	95	94	94	94	94	94	94	95	94	94	95
B) – Avena (Temp. di germinazione 22°C.).															
al 2° g. germinati %	12	14	11	16	12	41	39	43	40	41	53	50	54	51	49
„ 3° g. „ „	55	60	58	61	57	65	66	68	65	66	72	66	70	69	71
„ 4° g. „ „	90	92	92	90	94	93	92	91	92	94	95	93	94	91	90
„ 5° g. „ „	96	96	95	94	97	97	98	96	98	97	97	96	98	96	97
„ 6° g. „ „	98	97	96	98	97	98	98	98	98	98	97	98	98	97	97
„ 7° g.	98	97	96	98	97	98	98	98	98	98	97	98	98	97	97

al 3° g. germinati %	11	9	13	12	10	19	20	17	22	21	32	32	[illegible]	[illegible]	[illegible]
„ 4° g. „ „	50	42	47	51	49	55	54	50	49	58	60	63	64	59	62
„ 5° g. „ „	68	66	70	72	67	75	71	73	73	77	84	82	80	78	85
„ 6° g. „ „	81	82	85	83	81	86	85	82	84	85	91	91	91	90	92
„ 7° g. „ „	93	91	94	92	90	93	94	93	95	92	95	95	92	93	94
„ 8° g. „ „	94	95	94	93	93	93	94	95	95	93	95	95	92	93	95
„ 9° g. „ „	94	95	94	93	93	93	94	95	95	93	95	95	92	93	95

D) – Erba medica (Temp. di germinazione 22°C.).

al 1° g. germinati %	6	10	8	8	9	22	42	38	37	40	72	80	75	73	77
„ 2° g. „ „	44	40	42	43	40	56	66	59	62	64	96	94	95	96	94
„ 3° g. „ „	56	56	58	55	57	76	82	80	79	81	96	98	95	96	95
„ 4° g. „ „	76	74	78	74	76	95	97	91	93	94	96	98	95	96	95
„ 5° g. „ „	96	96	95	96	94	97	97	96	95	96	96	98	95	96	95

E) – Trifoglio (Temp. di germinazione 22°C.).

al 1° g. germinati %	8	11	7	10	9	28	31	30	34	36	80	74	70	85	90
„ 2° g. „ „	40	41	39	45	42	52	58	60	59	62	88	84	87	90	92
„ 3° g. „ „	49	53	50	51	50	78	80	83	79	81	94	93	95	94	96
„ 4° g. „ „	81	82	80	79	81	95	95	94	93	94	94	94	95	94	96
„ 5° g. „ „	94	95	94	95	95	96	95	94	95	94	94	94	95	94	96

Nelle serie (sempre in soluzione acquosa) nelle quali il verde malachite venne somministrato dopo che la pianta aveva raggiunto un relativo sviluppo si manifestò ugualmente arresto del medesimo e morte.

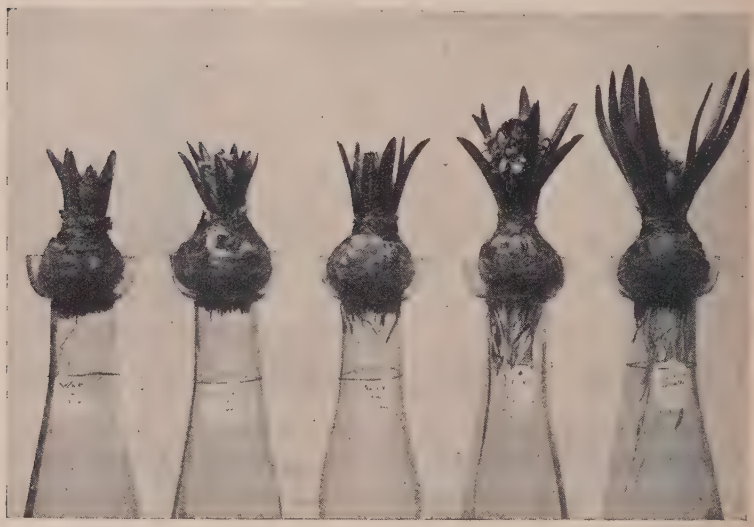


Fig. 3 – *Bulbi di Giacinto allevati in soluzioni contenenti verde malachite.* Da sinistra a destra v. m. 1:20000 – 1:50000 – 1:10000 – 1:2500000 – controllo. I bulbi vennero messi nei vasi di coltura il 20-X-1934; la soluz. veniva cambiata ogni 15 giorni; furono fotografati il 2-III-1935.

Soltanto nelle serie in terra gli effetti furono punto o poco sensibili. Ciò è intuitivo poichè il verde malachite viene trattenuto, in gran parte, per fenomeni di adsorbimento, dalle sostanze organiche del suolo.

Esperienze e considerazioni nei riguardi di una sua possibile applicazione pratica.

a) *Nei trattamenti relativi alla disinfezione dei semi.*

Fig. 4 – *Semi di fave germinati e sviluppati in presenza di verde malachite nelle concentrazioni di* 1:50000 *(a)* e 1:20000 *(b)*. In *(a)*, controllo.

Con riferimento a precedenti prove concernenti l'influenza del verde malachite sulla germinazione di spore di Carie e di Carboni e sulla germinazione di semi si vollero eseguire prove di trattamenti che furono condotte in parte nelle preselle del campo sperimentale del Laboratorio e in parte, mercè l'interessamento e la diretta collaborazione del Prof. G. Titta, nel Podere di S. Cataldo dell' Istituto.

Delle prime, che pur avrebbero avuto un valore indiziario, omettiamo di riferire essendosi verificati nelle colture danni per cause diverse oltre che in primavera parziale allettamento.

Sulle seconde, invece, pur rimandando per questioni di dettaglio ad un lavoro di G. Titta ([29]) ove se ne riferisce, vale la pena di soffermarsi.

TABELLA XVI. – Effetti di diversi trattamenti anticrittogamici ai semi di frumento in confronto al trattamento con verde malachite.

N. delle preselle	Metodi di concia e preparati messi in prova	Prodotto di granella ottenuto, in media, da presella di ~ mq. 160 Q.li ad Ea.	Differenza rispetto alla prova testimone il cui prodotto è fatto = 100		Differenze confrontate con 5 m (D)	
			in più	in meno	in più	in meno
3, 4, 11, 20	nessuno (testimoni)	29,38 ± 1,11	—	—	—	—
1, 8, 15, 16, 24	Sitosfero	29,36 ± 0,68	—	0,068 ± 4,42	—	0,068 ± 22,10
2, 9, 10, 17, 19	Solfato di Rame e calce	26,16 ± 1,71	—	10,95 ± 6,93	—	10,95 ± 34,65
5, 12, 13, 18, 22	Jensen	27,59 ± 0,44	—	6,09 ± 4,08	—	6,09 ± 20,40
6, 7, 14, 21, 23	Verde malachite 1:100000 imm. 3 ore	29,63 ± 0,83	0,85±4,69	—	0,85±23,45	—

Ad esse può attribuirsi una qualche importanza sia perchè eseguite su cinque grandi preselle di mq. 160 circa ciascuna, a disposizione alterna, sia perchè furono contemporaneamente messi a confronto altri trattamenti oltre al testimone.

Fu seminato frumento Gentil Rosso × Noè 40 selez. B. 44 TITTA il 19-20 novembre 1934 in ragione di Kg. 120 ad Ea. Coltura precedente: maggese – Concimazione: alla semina q.li 3 ad Ea. di perfosfato minerale; in copertura Kg. 90 ad Ea. di nitrato di calcio somministrato in tre volte (29-I; 12-II; 5-III). La vegetazione si svolse in ogni caso normalmente; non allettamento; non infezioni, nè infestioni. Il raccolto avvenne il 18 giugno 1935 con i risultati della Tab. XVI.

Come vedesi, adunque, mentre solfato di rame e calce e il trattamento secondo JENSEN hanno provocato una diminuzione di raccolto, con il verde malachite la produzione è stata paragonabile al controllo e, anzi, leggermente superiore. Il fatto tuttavia merita conferma tenendosi anche conto dei risultati anticrittogamici.

b) *Nei trattamenti peronosporici.*

Più complesso che non nel caso precedente sembrò mostrarsi il problema di una utile applicazione del verde malachite nei trattamenti peronosporici richiedendosi al composto maggiori requisiti avuto riguardo alla sua necessaria adesività.

Considerazioni teoriche suggeriscono a tale fine l'uso di molte sostanze: calce, caseina, gelatina, latte, saponi, melassa, destrina, alcool amilico, ecc. Praticamente, però, la calce é quella che più risulta efficace e che maggiormente trova conveniente impiego.

Ora, il problema che ci siamo posti fu di vedere se queste sostanze aggiunte al verde malachite modificano in qualche modo l'efficienza anticrittogamica del composto. Specialmente avuto riguardo alle sostanze di natura alcalina le quali, come fu premesso, determinano la formazione di leucobasi il cui comportamento, rispetto alla soluzione colorante, avrebbe potuto supporsi diverso.

Per poter formarci un'idea al riguardo abbiamo coltivato seguendo la solita tecnica alcune specie di Batteri, Lieviti, Funghi allestendo substrati al verde malachite presenti o non: latte 10 %; melasso 1 %; alcool amilico 1 %; gelatina 1 %; destrina 1 %; sapone molle 1 %; latte di calce 1 %. Inoltre ricercammo anche di fronte a pari quantità di verde malachite il potere antimicrobico della leucobase che ottenemmo mediante sufficienti aggiunte di una soluzione di KOH;

TABELLA XVII – Concentrazioni inibenti lo sviluppo di microrganismi in pres

Microrganismo	verde malachite	latte 10%	mela 1%
Bact. tumefaciens	1:1000	1:1000	1:100
— *campestre*	1:50000	1:50000	1:500
Bac. subtilis	1:200000	1:200000	1:200
— *asteris*	1:200000	1:200000	1:200
Sacch. ellipsoideus	1:500000	1:500000	1:500
— *cerevisiae*	1:200000	1:200000	1:200
Torulopsis sp. (susine)	1:750000	1:750000	1:750
Blastodendrion casei	1:50000	1:50000	1:500
Mycotorula Pinoyi	1:100000	1:100000	1:100
Acrostalagmus cephalosporioides . .	1:50000	1:50000	1:500
Alternaria tenuis	1:100000	1:100000	1:100
Aspergillus niger	1:50000	1:50000	1:500
Botrytis cinerea	1:50000	1:50000	1:500
Cladosporium herbarum . . .	1:50000	1:50000	1:500
Fusarium herbarum	1:50000	1:50000	1:500
Fusarium vasinfectum . . .	1:100000	1:100000	1:100
Macrosporium commune . . .	1:10000	1:10000	1:100
Microascus cirrosus	1:100000	1:100000	1:100
Scopulariopsis brevicaulis . . .	1:500000	1:500000	1:500
Trichotecium roseum	1:50000	1:50000	1:500
Verticillium albo-atrum . . .	1:200000	1:200000	1:200
— *tracheiphilum* . . .	1:200000	1:200000	1:200
— *ochorubrum* . . .	1:750000	1:750000	1:750

N. B. – Le concentrazioni segnate in corsivo indicano che lo sviluppo è stato pos

l substrato, di solo v. m. o del medesimo addizionato di sostanze adesive.

alachite con aggiunte di :						Sviluppo in presenza di KOH
alcool amilico 1%	gelatina 1%	destrina 1%	sapone 1%	calce 1%	KOH fino a formaz. di leucobase	
1:2000	1:1000	1:1000	1:1000	*1:1000*	1:2000	+
1:50000	1:50000	1:50000	1:50000	1:50000	1:10000	+
1:200000	1:200000	1:200000	1:200000	1:20000	*1:200000*	+
1:500000	1:200000	1:200000	1:200000	1:200000	*1:200000*	+
1:500000	1:500000	1:500000	1:500000	1:500000	1:500000	+
1:500000	1:200000	1:200000	1:200000	1:200000	*1:200000*	+
1:750000	1:750000	1:750000	1:750000	1:750000	*1:750000*	+
1:100000	1:50000	1:50000	1:50000	1:50000	1:100000	+
1:200000	1:100000	1:100000	1:100000	1:100000	*1:000000*	+
1:100000	1:50000	1:50000	1:50000	*1:50000*	*1:50000*	+
1:100000	1:100000	1:100000	1:100000	1:100000	1:100000	+
1:50000	1:50000	1:50000	1:50000	1:50000	1:100000	+
1:100000	1:50000	1:50000	1:50000	1:50000	1;100000	+
1:50000	1:50000	1:50000	1:50000	*1:50000*	1:100000	+
1:50000	1:50000	1:50000	1:50000	1:50000	*1:50000*	+
1:100000	1:100000	1:100000	1:100000	*1:100000*	*1:100000*	+
1:50000	1:10000	1:10000	1:10000	*1:10000*	1:20000	+
1:200000	1:100000	1:100000	1:100000	1:100000	1:100000	+
1:500000	1:500000	1:500000	1:500000	1:500000	1:500000	+
1:100000	1:50000	1:50000	1:50000	*1:50000*	*1:50000*	+
1:500000	1:200000	1:200000	1:200000	*1:200000*	*1:20000*	+
1:500000	1:200000	1:200000	1:200000	*1:200000*	*1:200000*	+
1:750000	1:750000	1:750000	1:750000	*1:750000*	1:750000	+

ma molto scarso, comunque inferiore ai controlli contenenti solo v. m.

in quest'ultimo caso al fine di ben discriminare l'azione in se, della base aggiunta, fu pure istituita una serie di colture presente KOH in quantità uguali a quelle necessarie alla formazione della leucobase nei substrati contenenti verde malachite.

I risultati figurano nella precedente Tabella XVII.

Come era prevedibile l'aggiunta al substrato di latte, melasso, gelatina, destrina, sapone, nelle proporzioni segnate, non ha in alcun modo influenzato il potere antimicrobico del verde malachite che rimane, per la presenza di tali sostanze, invariato.

Nè, tale potere antimicrobico, risulta depresso dalle aggiunte di alcool amilico, di sapone e di latte di calce; anzi, queste due ultime sostanze, in virtù della loro natura alcalina — per la quale si ha tendenza alla formazione della leucobase — sembrerebbero elevare il potere batteriostatico della sostanza colorante.

Difatti, contrariamente a quanto si sarebbe potuto anche pensare, la formazione di leucobase non annulla nè attenua gli effetti batteriostatici del verde malachite: la leucobase sperimentata ottenuta per addizione di idrato potassico sorte effetti maggiori che non quelli dimostrati dalla sostanza colorante.

La conclusione che ne discende, e che è poi la risposta al quesito che ci eravamo prospettato, è che la presenza del latte di calce non è incompatibile col verde malachite per cui la calce stessa potrebbe benissimo impiegarsi come sostanza adesiva.

Fissata tale conclusione sembrava opportuno di procedere a prove di campo. In questo primo anno la ricerca fu limitata all'indagine del comportamento del verde malachite somministrato in soluzione acquosa alle viti. Anzi, se ciò si è potuto fare con una certa ampiezza al fine di ottenere un reperto di un qualche valore, lo dob-
alla gentilezza e all'interessamento del signor Giuseppe Salvadori di Soiana (colline di Pontedera) che qui vivamente ringraziamo.

Furono così eseguiti due esperimenti: quello di Soiana, in campo, su di un numero considerevole di viti: ed uno nell'orto sperimentale del Laboratorio su di un numero di viti limitato. Nel primo caso la soluzione fu somministrata nella concentrazione di 1:10000; nel secondo di 1:100000.

Volendosi paragonare l'azione del verde malachite con quella della comune poltiglia cupro-calcica, i trattamenti vennero eseguiti in

uguale numero e contemporaneamente.(*) Alcune viti, non trattate, furono lasciate di controllo dell'infezione peronosporica.

Orbene, i risultati, furono negativi in pieno ed in ogni caso. Nella prova condotta nel nostro orto, e giornalmente controllata, sembrava in seguito ai primi trattamenti che le viti mostrassero una certa resistenza all' infezione peronosporica, pur presentandosi in condizioni di inferiorità rispetto a quelle trattate con solfato di rame e calce; ma ben presto assunsero l'aspetto del controllo in cui non rimasero nè una foglia nè un tralcio sani.

Pensiamo che le cause dell'insuccesso più che dal dubbio potere antiperonosporico sieno dipese, essenzialmente, dal fatto di non essere stata trattenuta, la soluzione, sulla superficie delle foglie.

Prove complementari saranno istituite nel nuovo anno con aggiunte di latte di calce al verde malachite.

c) *Nei trattamenti chemioterapici interni.*

Il fatto che le soluzioni coloranti a potere inibitorio agiscono (come il verde malachite) sulla generalità dei microrganismi anche a diluizioni fortissime ci ha suggerito di tentare alcune esperienze di chemioterapia interna avuto riguardo specialmente alle malattie di natura vascolare. Pensando con Petri ([30]) che per la somministrazione della sostanza il metodo migliore debba consistere nell'assorbimento radicale per radici intatte abbiamo, nelle non molte esperienze intraprese, agito in conformità. Si sono, cioè, coltivate le piante in soluzione acquosa di Knop addizionata di una soluzione di verde mala-

(*) – Inutile aggiungere che le irroratrici destinate all'uso della somministrazione del verde malachite erano nuove. Questa avvertenza è semplicemente di rigore o di scrupolo e fu suggerita dal dubbio che le irroratrici in uso per la poltiglia rameica non venissero, di volta in volta, bene lavate. Aggiungiamo inoltre che la soluzione di v. m. non venne mai fatta in recipienti di legno, che fissa il colorante, ma in recipienti metallici.

chite allorquando le piantine avevano raggiunto un certo sviluppo e vari giorni prima dell'introduzione del parassita.

Una prima esperienza fu eseguita con la coppia Ricino-*tumefaciens* ed una seconda con Giacinto- *Bact. hyacinthi.* La soluzione di verde malachite — sette giorni prima dell'innesto dei germi — venne aggiunta in quantità tali da essere presente, nei liquidi nutritivi, nelle concentrazioni di 1:50000 ed 1:100000. Altre piante, come controllo ed ugualmente infettate, vennero allevate in presenza di sola soluzione di Knop. L'inoculazione dei germi fu eseguita per mezzo di siringa.

Orbene, i risultati furono negativi. Nel caso dei giacinti i bulbi di questi andarono incontro al marciume giallo da *Bach. hyacinthi* sia nei controlli che in quelli allevati in presenza di soluzioni di verde malachite. Nel caso delle piantine di Ricino la formazione o l'inizio della formazione di tessuti neoplastici in conseguenza dell'inoculazione di *Bact. tumefaciens* (quali si manifestarono nei controlli) non ebbe modo di verificarsi per la sopraggiunta morte delle piantine.

Questa ultima constatazione si ricollega al risultato dell'esperienze riferite a pag. 457, relative all'influenza esercitata dal verde malachite sulle piante le quali dimostrano la sua azione dannosa, fissandosi il colorante nelle membrane cellulari e ostacolando od impedendo in tal modo i fenomeni di assorbimento radicale.

È nostra intenzione di ripetere ed estendere queste esperienze operando con piante suscettibili di attacchi da parte di funghi tracheifili; ma fin d'ora sulla scorta di quanto è stato rilevato siamo propensi ad ammettere l'inefficacia del verde malachite nei trattamenti chemioterapici interni. La quale è subordinata all'entrata in circolo della sostanza ad azione terapeutica il che non sembra avvenire nel caso del verde malachite.

III – Conclusioni generali

Cimentando numerosi microrganismi – Batteri, Lieviti, Funghi – di fronte a varie sostanze coloranti aggiunte in diverse concentrazioni ai substrati colturali è stato osservato che la maggior parte di queste

sostanze dimostra di possedere un effetto inibitorio dello sviluppo assai debole, se non nullo, almeno nei limiti delle concentrazioni più elevate provate (1:1000). L'effetto massimo è stato raggiunto con verde malachite a cui fa seguito il verde brillante e poi il violetto di genziana. In linea di massima, i Batteri si addimostrerebbero più resistenti: a questi seguirebbero i funghi a micelio, indi i funghi gemmanti.

Particolarmente indagato su colture brute e colture pure il potere batteriostatico del verde malachite, questo si è dimostrato agire, in certi casi, anche nelle concentrazioni di 1:500000-1:750000.

Eseguite con verde malachite esperienze sulla germinazione di spore di Carie e Carboni è risultato che queste non germinano se presente in determinate concentrazioni (1:100 000) il composto. Se però le spore si tengono in contatto limitato con il colorante e si trasportano poi in un mezzo che ne sia privo la germinazione, sia pure in percentuale inferiore al controllo, avviene ugualmente.

Messi, in presenza di soluzioni di verde malachite, conidi di *Plasmopara viticola* essi non dettero luogo a formazione di zoospore.

Indagata l'influenza del v. m. sulla germinazione di semi di Graminacee e di Leguminose fu osservato che nessun danno essi subiscono anche per trattamenti prolungati (6 ore) in concentrazioni relativamente forti (1:10000). Per contro non si verificò alcun effetto stimolante.

Indagata l'influenza del v. m. sullo sviluppo delle piante fu constatato che le piante subiscono danno, più o meno evidente a seconda delle condizioni di esperimento, dalla presenza della sostanza colorante che, fissandosi nelle pareti cellulari delle cellule assorbenti, impedisce od ostacola i fenomeni dall'assorbimento e della nutrizione.

Esperienze di trattamenti miranti alla disinfezione di semi eseguite su frumento coltivato in grandi preselle hanno sortito esito favorevole, essendosi ottenuta maggiore produzione che non nei controlli non trattati ed anche in confronto del trattamento con solfato di rame e calce.

Trattamenti di solo verde malachite in soluzione 1:100 000 - 1:10 000 eseguiti su viti a fine antiperonosporico sono risultati invece inefficaci verosimilmente per mancata adesività.

A tale riguardo, indagato se la sostanza adesiva alterasse il potere antimicrobico del verde malachite, è stato osservato che nessuna variazione esso potere subisce per aggiunte di latte, destrina, gelatina, melasso; si accentua anzi in presenza di alcool amilico e forse anche di saponi o di calce e nonostante la tendenza a formarsi, per l'aggiunta di tali ultime sostanze, la leucobase. La quale, ottenuta per addizione di convenienti quantità di alcali potassico, presenta un comportamento antimicrobico da ritenersi superiore alla sostanza colorante di origine. Prove complementari da eseguirsi nel nuovo anno agrario diranno dell'efficacia antiperonosporica del verde malachite in presenza di calce.

Eseguite, infine, prove di chemioterapia interna a mezzo di Ricino - *tumefaciens* e Giacinto - *Bact. hyacinthi*, queste anche hanno dato risultati negativi per la mancata entrata in circolo della sostanza colorante in esperimento.

Pisa - Laboratorio di Biologia Vegetale
del R. Istituto Superiore Agrario

LAVORI CITATI

(1) – HOUBEN e WOLLENWEBER, Hexylresorsin und Phenyläthylresorsin gegen pflanzenpathogene Pilze. *Bioth. Zeitschr.* p. 448, 1929.

(2) – LEONIAN, Studies on the variability and dissociation in the genus Fusarium. *Phytopath.* 1930.

LEONIAN, Differential growth of Phytophthoras under the action of malachite green. *Americ. Journ. of Botany*, p. 671, 1930.

(3) – GUYOT, Particularités de culture du mycelium d'Armillaria en milieu stérile. *Rec. in Review of Applied Mycology*, p. 278, 1930.

(4) – VANDERWALLE, Pouvoir fongicide de certaines substances vis-à-vis du Botrytis cinerea. – Citato da BOUDRU, – v. (6).

(5) – DESSY, La chemiothérapie des mycoses. *Soc. Int. di Microbiologia.* Bull. della Sez. Italiana, 1933.

(6) – BOUDRU, Quelques notes sur la biologie du Ceratostomella Ulmi (Schwarz) Buisman, agent de la Thyllose parasitaire de l'Orme. *Bull. de l' Inst. Agron. de Gembloux*, **2**, *310*, 1933.

(7) – VERONA e CECCARELLI, Su di una tracheomicosi dell'Amaranto prodotta da una specie di Fusarium e da Verticillium amaranti n. sp. e, in genere, sulla biologia di alcnni Verticillium patogeni. *Phytopathologische Zeitschrift* **8**, *373*, 1935.

(8) – BUCHANAN e FULMER, Physiology and Biochemistry of Bacteria: II vol., Londra 1930.

(9) – GRAHAM - SMITH, Some factors influencing the action of dyes and allied compounds on bacteria - *Journ. Hyg. (Cambridge)* **18**, *1*, 1919.

(10) – GAY e MORRISON, Experimental Streptococcus empyema. II Attempts at dye therapy - *Journ-Infect. Diseases*, **28**, *1*, 1921.

(11) – HOLT-HARRIS e TEAGNE, A new culture medium for the isolation of Bac. typhosus from stools. *Journ. Infect. Diseases* **18**, *596*, 1916.

(12) – KLIGLER, A study of the antiseptic properties of certain organic compounds. *Jour. Expt. Med.*, **27**, *463*, 1918.

(13) – BECKWITH, The viability of B. typhosum in alkaline bile in vivo. *Proc. Soc. Expt. Biol. and Med.*, **18**, *36*, 1921.

(14) – GILBERT e COLEMANN, Brilliant-green enrichment methods in the examination of feces for organisms of the enteric group. *Journ. Infect. Diseases*, **44**, *21*, 1929.

(15) – BROWNING e GILMOUR, Bactericidal action and chemical constitution with special reference to basic benzol derivatives. *Jour. Path. and Bact.*, **18**, *144*, 1913.

(16) – CHURCHMAN, Further studies on the behavior of bacteria toward gentian violet. *Jour. Expt. Med.*, **33**, *569*, 1921.

CHURCHMAN, The selective bactericidal action of gentian violet, *ibidem*, **16**, *221*, 1912.

CHURCHMAN, The effects of slight increase of temperature on the bacterio-

static power of gentian violet. *Johns Hopkins Hosp. Bul.*, **33**, *227*, 1922.

(17) – KRUMWIEDE e PRATT, Observation on the growth of bacteria on media containing various aniline dyes. *Jour. Expt. Med.*, **19**, *20* 1914.

(18) – HALL e ELLEFSON, The elimination of spurious presumptive tests for B. coli in water by the use of gentian violet. *Jour. Bact.*, **3**, *329*, 1918.

HALL e ELLEFSON, A brief note on the use of gentian violet in presumptive testes for B. coli in milk with reference to sporulating anaerobes, *ibidem*, **3**, *355*, 1918.

(19) – BURKE e SKINNER, Resistance of bacterial spores to the triphenylmethane dyes. *Jour. Expt. Med.*, **41**, *471*, 1925.

(20) – HUDDLESON e ABELL, Behavior of Brucella melitensis and Br. abortus toward gentian violet. *Jour. Infect. Diseases*, **43**, *81*, 1928.

(21) – NOGUCHI, The nature of the antitetanic action of eosin. *Jour. Expt. Med.*, **9**, *281*, 1907.

(22) – SCHIEMANN e BAUMGARTEN, Reagensglasversuche über die Wirkungen vor Acridin - und anderen Farbstoffen auf Bakterien - *Ztschr. Hyg. u. Infectionskrank.*, **97**, *247*, 1923.

(23) – BENNETT, Fusarium patch disease of bowling and golf greens. *Journ. Board. Greenkeeping Res.* **9**, *79*, 1933.

(24) – MUNRO e NEWTON, The inhibition of the growth of fungi by chemicals. *Scient. Agric.* **10**, *560*, 1934.

(25) – LOEFFLER, Zum Nachweis und zur differential Diagnose der Typhus - bazillen mittels der Malachitgrünnährboden -*Deut. Med. Wochenschr.*, **33**,*1581*, 1907

(26) – ZAVAGLI, Annali di Igiene, **43**, *1*, 1933.

(27) – TRUFFAUT e PASTAC, La chémiotherapie des maladies des plantes par des colorants organiques. *C. R. Ac. de Sc.* **189**, *1013*, 1929.

(28) – MUNERATI, (secondo notizie fornite, gentilmente, per lettera) provò il verde malachite contro la *Cercospora beticola* e in confronto con l'auramina, l'eosina e la poltiglia bordolese. Come adesivo aggiunse, ai coloranti, alcool amilico. Nessuno dei composti impiegati, anche con applicazioni bisettimanali, manifestò di possedere un' azione infrenatrice del fungo eccettuato il verde malachite che appalesò visibilmente una certa efficacia ma in ogni caso nettamente inferiore a quella della poltiglia rameica.

(29) – TITTA, Sopra la concia del seme del grano. *Questo Bollettino.*

(30) – PETRI, La terapia interna nella Patologia Vegetale. *Boll. R. Staz. di Pat. Vegetale* - Roma, 1927.

(Presentata il 6 dicembre 1935 – XIV.)